

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

IMPLICACIÓN DE LAS QUINASAS DEPENDIENTES  
DE CICLINAS EN EL CICLO CELULAR Y LA  
RESPUESTA FRENTE A DAÑO AL ADN

Tesis Doctoral

Antonio Cerqueira Eced

Madrid, 2009

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

IMPLICACIÓN DE LAS QUINASAS DEPENDIENTES  
DE CICLINAS EN EL CICLO CELULAR Y LA  
RESPUESTA FRENTE A DAÑO AL ADN

Antonio Cerqueira Eced  
Licenciado en Bioquímica

Este trabajo se ha realizado en el programa de Oncología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas bajo la dirección de los Drs. Mariano Barbacid Montalbán y David Santamaría Velilla.

## CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS

El doctorando Antonio Cerqueira Eced ha realizado su trabajo de Tesis Doctoral en el laboratorio de Oncología Experimental del Programa de Oncología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas en Madrid desde Febrero de 2004 hasta Enero de 2009. Dicha tesis se ha realizado bajo la dirección de los Drs. Mariano Barbacid Montalbán y David Santamaría Vellilla y la tutoría de Dra. Carmela Calés Bourdet.

En Madrid, a 27 de Enero de 2009

Mariano Barbacid Montalbán  
Director  
Centro Nacional de  
Investigaciones Oncológicas

David Santamaría Vellilla  
Investigador Científico  
Centro Nacional de  
Investigaciones Oncológicas

Carmela Calés Bourdet  
Profesor Titular  
Instituto de Investigaciones  
Biomédicas “Alberto Sols”

Desde que terminé la carrera allá por 2002 me planteé hacer la tesis, si bien antes quise conocer cómo funcionaba este mundillo e incrementar mi formación. Por ello decidí irme unos meses a Irlanda a mejorar el inglés y a tener una experiencia en un laboratorio foráneo. Allí trabajé en el grupo de Charles Dorman, al cual agradezco por haberme acogido, bajo la dirección de Padraig Deighan. Padraig me trató de maravilla además de enseñarme muchas cosas. Todo ello se lo agradezco. Pronto me di cuenta de que entrar en un buen grupo de investigación era casi más determinante en la carrera profesional de un científico que su propia valía. Por ello, cuando regresé a Madrid, quise tomar el tiempo necesario hasta que se presentara una buena oportunidad. Durante ese tiempo tuve la suerte de trabajar en el laboratorio de Maite Serra, en el CIB. Allí me enseñaron muchas cosas y me sentí como en casa. Les tengo mucho que agradecer a todo el grupo Gema Myriam, Alfonso y por supuesto, a Maite. Unos cuantos meses más tarde tuve la gran oportunidad esperada y así el 24 de Diciembre de 2003 tuve la enorme suerte de entrevistarme con el Dr. Mariano Barbacid para cubrir una plaza de estudiante predoctoral en su grupo. Afortunadamente, Mariano confió en mi y eso es algo por lo que le estoy profundamente agradecido.

En Enero de 2004 me incorporé al grupo de Oncología Experimental del CNIO. La verdad es que me sentía tan satisfecho por poder hacerlo como impresionado por entrar en un grupo tan importante. Siempre había tenido la idea de que los grupos potentes eran grupos con un ambiente muy competitivo en el cual las relaciones humanas sucumbían ante la vorágine del trabajo. Para mi sorpresa eso no fue así. Si algo me sorprendió desde el primer momento que llegué al laboratorio fue el extraordinario ambiente de compañerismo que había. Al principio empecé con un par de proyectos que no fueron a ninguna parte. El primero fue *recombineering* en el que estuve unos meses y el segundo, un proyecto de proteómica en el que estuve algo más de un año y que aunque no dio frutos, aprendí mucho. En ese proyecto de proteómica trabajé con Marta Puyol, una persona que admiro y que ha hecho muchísimo más agradable no solo esa etapa sino toda mi trayectoria por el laboratorio ¡Muchas gracias por todo!. Estando sumido en un proyecto que no evolucionaba, apareció Alberto Martín para ofrecerme continuar un proyecto suyo de un triple KO de Cdk2 p21 y p27. Alberto no solo me ofreció el proyecto sino toda su ayuda y enciclopédico conocimiento del que seguramente sea el mejor predoctoral que haya conocido. Ello ocupó mi tiempo en los sucesivos meses hasta que David Santamaría y Cédric Barrière me ofrecieron la enorme oportunidad de colaborar en el proyecto más excitante del grupo, la caracterización de un modelo DKO para Cdk2 y Cdk4 y de un modelo TKO para Cdk2, Cdk4 y Cdk6. Esos fueron los meses más productivos de mi etapa como estudiante predoctoral. David y Cédric además de permitirme realizar experimentos con un modelo en el que todos los resultados eran de gran relevancia, me enseñaron todo lo que ahora sé sobre ciclo celular, funcionamiento de un laboratorio y cómo se publica un artículo científico.

No había mencionado a David hasta ahora, si bien en toda la etapa previa a incorporarme en su proyecto, siempre nos ayudó a Marta y a mi en los sinsabores proteómicos. David no sólo me ayudó en ese proyecto, sino que una vez acabado y publicado el paper del TKO, se implicó directamente en el análisis de los checkpoints de esas células y del papel de las Cdks en la respuesta frente al daño al ADN. Su ayuda es simplemente inestimable. David es un gran científico y aun mejor persona a la que le debo esta tesis. Por suerte, en el proyecto del daño al ADN contamos con la codirección de Oscar Fernandez Capetillo y de la colaboración de gente de su grupo como Myriam Cuadrado y Bárbara Martínez. Estoy muy agradecido a ellas en particular y a todo el grupo de Inestabilidad Genómica por habernos ayudado a explorar un territorio que nos era desconocido hasta el momento.

Está claro que los “investigadores” no seríamos nada si no fuera por todo el personal de apoyo. Millones de gracias a los técnicos del laboratorio, Mari Carmen González, Marta San Román y Raquel Villar. Vuestra ayuda no se ha limitado a la faceta experimental sino a crear un envidiable buen ambiente en el laboratorio. Gracias a Blanca Velasco, Concepción Timón y al resto de técnicos del animalario por vuestro trabajo. Muchas gracias a Arancha por enseñarme a usar ese endiablado aparato que es el FACs y gracias muy especialmente, a Diego Megías por soportarme tantas horas en el confocal y siempre estar animando y sugiriendo soluciones a los infinitos problemas técnicos y experimentales que hemos tenido. Gracias también a la gente de proteómica, Jose Antonio, Emilio y Enrique del CNIC y a Patricia del CNIO que tan bien trabajó y con la que tanto aprendí. Gracias por supuesto a Susa, por ayudarnos siempre con todas las gestiones, envíos y por su amabilidad.

Estas personas que menciono son las que han contribuido profesionalmente en mayor grado al desarrollo de esta tesis, pero no me puedo olvidar de otras personas que han contribuido sobre todo personalmente al desarrollo de la misma. Muchas gracias a Javier Galán (la persona más divertida que he conocido) no solo por tantas risas que hemos tenido, sino por tantas discusiones científicas y extra-científicas que sin duda me han enriquecido. Gracias a Alberto Jimenez “Chumi” por alegrarnos la vida a todo el laboratorio y por ser un modelo de entrega absoluta a la ciencia. No tengo ninguna duda de que el mundo científico te recompensará en algún momento por ello. Gracias al resto de la gente del laboratorio, Rafa”B” por ser tan buena gente y enfadarse de modo tan divertido. Gracias a Mikel, Mr. High-throughput. Gracias a Yelena, Matthias, las Carolinas, las Saras y a Isabel. Como decía más arriba nunca hubiera imaginado un grupo de gente mejor que el que he encontrado aquí y no solo estos sino todos los que han pasado por el laboratorio, Ana, Saker, Eli...

Para finalizar, tengo que agradecer a las personas que me han ayudado y apoyado antes, durante y seguro que cuando acabe la tesis. Infinitas gracias a mis padres, a mi hermano Pablo, a Gema a Nerea y a Blanca por soportar las trabas del mundo científico y nunca protestar a pesar de mis demenciales horarios de trabajo que muchas veces trastocaban los planes familiares. No sería nada sin vosotros.

A mis padres Matilde y Antonio

A Pablo, Gema, Nerea y Blanca

**RESUMEN**

En los últimos años, mediante el uso de modelos de ratón, otros grupos y el nuestro han cuestionado la esencialidad de algunas de las Cdks que participan en el ciclo celular de mamíferos (Santamaría y Ortega, 2006). Como prueba genética definitiva, nuestro grupo generó un modelo sin las tres Cdks de interfase (Santamaría et al., 2007). En esta tesis se demuestra que el mecanismo mínimo presente en levaduras y que cuenta con tan solo una Cdk, es suficiente para satisfacer el desarrollo del ciclo celular en células de mamíferos. De este modo, Cdk1 es capaz de unir a las tres Ciclinas de interfase. Su eliminación imposibilita que el ciclo progrese en cualquiera de sus fases en ausencia de las otras Cdks. Así mismo, se muestra que las Cdks de G1 y S pueden tener un papel más necesario en G2 que en sus fases canónicas.

En esta tesis también se ha analizado la implicación de las Cdks en la respuesta frente a daño al ADN. Hasta el momento se sabía que las Cdks eran las dianas moleculares que los puntos de control tenían para detener la progresión por el ciclo celular. De esta manera se permitía que la célula pudiera reparar el daño. En la presente tesis concluimos que las Cdks de interfase son prescindibles para este proceso. Así mismo, en un proceso dependiente de actividad Cdk y restringido a G2 como es la reparación por recombinación homóloga, demostramos que existe un gran grado de compensación entre todas las Cdks. Por tanto, del mismo modo que Cdk1 puede compensar a las Cdks de interfase para conducir el ciclo, presumiblemente, las Cdks de G1, pueden compensar la ausencia de las dos quinasas de G2, Cdk1 y Cdk2 en el proceso de reparación mediante recombinación homóloga.

**SUMMARY**

During the late years several mouse models developed by other groups and ourselves questioned the essentiality of some of the Cdks described to participate in the mammalian cell cycle (Santamaría y Ortega, 2006). As a definitive genetic proof, our lab developed a triple Knock out model for the interphase Cdks (Santamaría et al., 2007). In this thesis we demonstrate that the minimal mechanism present in yeast and based on just one Cdk, Cdk1, is also sufficient to satisfy the development of the mammalian cell cycle. This way, Cdk1 is able to join all of the interphase Cyclins. Moreover, the elimination of Cdk1 stops the cycle in all the phases, in the absence of the interphase Cdks.

In this thesis we also examine the implication of the Cdks in the DNA damage response. So far it was known that the Cdks were the molecular target of the Checkpoints to stop the cycle. In order to have enough time to repair the damaged DNA. In this thesis we conclude that the interphase Cdks are not essential for this process. In addition, we demonstrate that there is a high degree of Cdk compensation in a process restricted to G2 where Cdk activity is essential: DNA repair through homologous recombination. In the same way that Cdk1 is able to compensate the interphase Cdks to drive the cell cycle, presumably, The G1 Cdk's are able to compensate the absence of the two G2 kinases, Cdk1 and Cdk2 in the particular process of repair through homologous recombination.



# Índice



<b>CLAVE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1. <i>EL CICLO CELULAR:</i> .....	11
1.1 <i>Salida de quiescencia y progresión por la fase G1 del ciclo</i> .....	12
1.2 <i>La transición G1/S</i> .....	14
1.2.1 <i>Movilización de inhibidores Cip/kip y segundo descenso en los niveles de p27</i> .....	15
1.2.2 <i>Inactivación de Rb</i> .....	15
1.3 <i>La fase S del ciclo, la transición G2/M y mitosis</i> .....	16
2 <b>CICLINAS DEPENDIENTES DE QUINASAS:</b> .....	17
2.1 <i>Estructura de las Cdks</i> .....	17
2.2 <i>Regulación de las Cdks</i> .....	18
2.2.1 <i>Asociación con Ciclinas</i> .....	19
2.2.2 <i>Interacción con moléculas inhibitorias</i> .....	19
2.2.3 <i>Modificaciones postraduccionales</i> .....	20
2.2.3.1 <i>Fosforilación activadora</i> .....	20
2.2.3.2 <i>Fosforilaciones inhibitoras</i> .....	20
2.3 <i>Modelos animales deficientes en Cdks</i> .....	21
2.3.1 <i>Modelos deficientes en Cdk4</i> .....	22
2.3.2 <i>Modelos deficientes en Cdk6</i> .....	22
2.3.3 <i>Modelos con deficiencia combinada en Cdk4 y Cdk6</i> .....	22
2.3.4 <i>Modelos deficientes en Cdk2</i> .....	23
2.3.5 <i>Modelos con doble deficiencia en Cdk2 y Cdk6</i> .....	24
2.3.6 <i>Análisis de fibroblastos embrionarios procedentes de modelos murinos deficientes en Cdks</i> .....	24
3 <b>RESPUESTA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN:</b> .....	25
3.1 <i>Organización general de las rutas de respuesta frente al daño en el ADN</i> .....	26
3.1.1 <i>Identificación del daño</i> .....	27
3.1.1.1 <i>Rotura de doble cadena</i> .....	27
3.1.1.2 <i>Alteraciones que bloquean la replicación. ADN de cadena sencilla</i> .....	27
3.1.2 <i>Transductores</i> .....	28
3.1.3 <i>Efectores</i> .....	28
3.2 <i>Checkpoints, ciclo celular y Cdks</i> .....	28
3.3 <i>Reparación del ADN</i> .....	29
3.3.1 <i>Reparación por NHEJ</i> .....	19
3.3.2 <i>Reparación por HR</i> .....	30
3.3.3 <i>Cdks y elección del sistema de reparación</i> .....	30
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
1 <i>Mantenimiento y genotipado de los ratones</i> .....	39
2 <i>Preparación de fibroblastos embrionarios de ratón</i> .....	40
3 <i>Condiciones de cultivo</i> .....	40
4 <i>Ensayos de proliferación celular</i> .....	40
5 <i>Inmunotición de células marcadas con BrdU y análisis mediante citometría de flujo</i> .....	41
6 <i>Transfecciones e infecciones retrovirales y lentivirales</i> .....	42
7 <i>Análisis de los Checkpoints</i> .....	43
8 <i>Inmunofluorescencia</i> .....	43
9 <i>Microscopía de gran productividad</i> .....	44
10 <i>Ensayo de hipersensibilidad frente al daño al ADN</i> .....	45
11 <i>Extracción de ADN y proteínas</i> .....	45
12 <i>Western Blot</i> .....	45
13 <i>Inmunoprecipitación y ensayo quinasa</i> .....	46
14 <i>PCR</i> .....	46

15 Micromatrices de ADN.....	46
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
1. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN EN AUSENCIA DE Cdk2 y Cdk4:.....	51
1.1 Caracterización in vitro del ciclo celular y la proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4.....	51
1.1.1 Proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4.....	51
1.1.2 Inmortalización en ausencia de Cdk2 y Cdk4.....	51
1.1.3 Entrada en fase S desde quiescencia en ausencia de Cdk2 y Cdk4.....	51
1.2 Análisis bioquímico de embriones Cdk2 <sup>-/-</sup> Cdk4 <sup>-/-</sup> .....	52
1.1.1 Análisis de los niveles de proteínas de ciclo celular.....	52
1.1.2 Complejos Cdk-Ciclina en ausencia de Cdk2 y Cdk4.....	53
2. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO CELULAR EN AUSENCIA DE LAS TRES QUINASAS DE INTERFASE, Cdk4, Cdk6 y Cdk2.....	54
2.1 Análisis bioquímico de los embriones Cdk4 <sup>-/-</sup> Cdk6 <sup>-/-</sup> Cdk2 <sup>-/-</sup> .....	54
2.1.1 Niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular y estado de fosforilación.....	54
2.1.2 Complejos Cdk-Ciclina en ausencia de las tres Cdks de interfase.....	55
2.1.3 Actividad quinasa asociada a Ciclinas de G1 y S en ausencia de Cdk4, Cdk6, Cdk2.....	55
2.2 Análisis in vitro del ciclo celular en ausencia de las tres Cdks de interfase.....	56
2.2.1 Proliferación in vitro en ausencia de las Cdks de interfase.....	56
2.2.2 Salida de quiescencia in vitro en ausencia de las Cdks de interfase.....	57
2.2.3 Cdk1 conduce el ciclo celular en ausencia de las Cdks de interfase.....	58
2.2.4 Análisis del ciclo celular en ausencia de Cdks de interfase.....	60
2.2.5 Efecto de la sobre-expresión de inhibidores de Cdks de las familias INK4 y Cip/Kip en la distribución del ciclo celular en MEFs TKO.....	63
2.2.6 Duplicación del centrosoma en ausencia de las tres Cdks de interfase.....	64
3 RESPUESTA FRENTE AL DAÑO EN EL ADN EN AUSENCIA DE CDKS DE INTERFASE.....	65
3.1 Análisis de las rutas de señalización de daño al ADN en ausencia de las Cdks de interfase.....	65
3.2 Funcionalidad de los Checkpoints en ausencia de las tres Cdks de interfase.....	67
3.2.1 El Checkpoint de G1/S es funcional en ausencia de las Cdks de interfase.....	67
3.2.2 El Checkpoint de G2/M es funcional en ausencia de las Cdks de interfase.....	67
3.3 Análisis de la implicación de las Cdks en reparación del ADN dañado.....	68
3.3.1 La recombinación homóloga puede ser dirigida por las Cdks de interfase.....	70
3.3.2 El nivel total de actividad Cdk controla la reparación por HR y el checkpoint de G2/M.....	73
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
1 Cdks y ciclo celular, evidencias bioquímicas y genéticas.....	77
2 Ciclo celular en ausencia de Cdk2 y Cdk4.....	78
3 Ciclo celular en ausencia de las tres Cdks de interfase: Cdk4, Cdk6 y Cdk2.....	81
4 Las Cdks de G1 y S son más relevantes para G2.....	83
5 En mamíferos coexisten varios ciclos celulares.....	84
6 Señalización de los checkpoints en ausencia de las Cdks de interfase.....	172
7 Las Cdks de interfase son prescindibles para la reparación.....	88
8 Cdks y reparación mediante recombinación homóloga.....	89
9 Cdks y ciclo celular: Nuevos interrogantes.....	90
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>113</b>

# **Clave de abreviaturas**



Aph: Afidicolina

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated.

ATR: Ataxia-telangiectasia mutated and Rad 3 related.

BrdU: Bromodeoxiuridina.

CAK: Cdk activating kinase (Kinasa activadora de Cdk)

Chk1: Checkpoint kinase 1 (Quinasa de Checkpoint 1)

Cdk: Cyclin dependent kinase (Quinasa dependiente de Ciclina)

Cip: Cdk inhibitory protein (Proteína inhibidora de Cdk)

CtIP: CtBP-interacting protein (Proteína que interacciona con CtBP)

DDR: DNA damage response (Respuesta frente al daño al ADN)

DMEM: Dulbecco modified Eagle's medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

DSB: Double strand break (Rotura de doble cadena)

FBS: Fetal Bovine Serum

G1: Gap1

G2: Gap2

$\gamma$ -H2AX: Histona H2A variante H2AX, fosforilada en la Serina139

HR: Homologous recombination (Recombinación homóloga)

INK4: Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor

Kip: Kinase inhibitory protein (Proteína inhibidora de quinasa)

KO: Knock out (término que se emplea para designar la deficiencia en un gen generada por ingeniería genética)

MEFs: Mouse embryonic fibroblasts (Fibroblastos embrionarios de ratón)

MMS: Metil-metanosulfonato

MRN: Complejo compuesto por Mre11, Rad50 y Nbs1.

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole)

NCS: Neocarzinoestatina

NHEJ: Non homologous end-joining (Unión de extremos no homólogos)

pH3: histona H3 fosforilada (Ser10)

Rb: Retinoblastoma protein

T121: Fragmento de 121 aminoácidos del antígeno T grande del virus SV40

TKO: Triple knock out



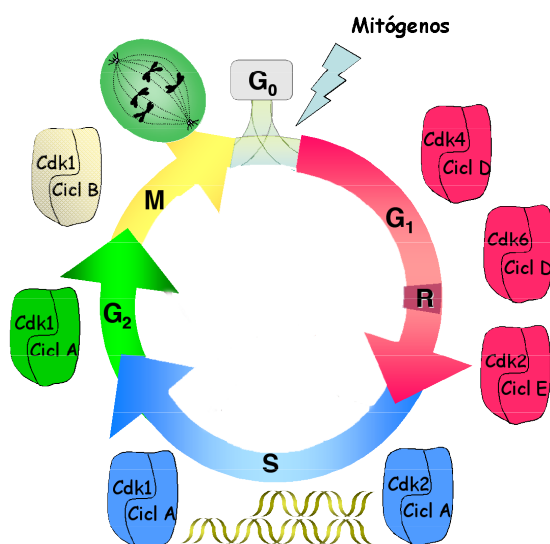
# Introducción



## 1. EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es una secuencia ordenada de eventos que conducen la proliferación y la división celular de modo que una célula da lugar a dos células hijas.

Toda célula cuando se divide necesita asegurar la generación de una sola copia totalmente fiel al molde original de su material genético y garantizar el reparto equitativo entre las dos células hijas resultantes. De este modo las células consiguen salvaguardar su integridad genómica y perpetuarse a lo largo de las generaciones. Duplicación del material cromosómico (fase S o de síntesis) y reparto del mismo (fase M o mitosis) son los dos procesos esenciales que sirven para definir los dos principales estadios del ciclo (Norbury y Nurse, 1992). Precediendo a cada una de estas dos etapas se han descrito otras dos, denominadas G1 y G2 (del inglés Gap1 y Gap2), durante las cuales las células se preparan para abordar las fases S y M respectivamente. Si la célula decide dejar de proliferar abandona el ciclo celular y entra en una fase de reposo o quiescencia llamada G0 (fig.1).



**Figura1. Esquema de las fases del ciclo celular y la distribución de los complejos Cdk-Ciclina a lo largo de las mismas.** La llegada de señales mitogénicas a la célula quiescente(G0) estimula la progresión a lo largo del ciclo celular:G1, S, G2 y M. Los motores del ciclo serán: Durante la fase G1 los complejos Cdk4/6-CiclinaD y Cdk2-CiclinaE. Durante la fase S Cdk2/1-CiclinaA. En mitosis Cdk1-CiclinaB

Los organismos eucariotas disponen de complejos mecanismos de control, que les permiten asegurar una correcta ejecución de los procesos anteriormente descritos. Así, en la progresión precisa y ordenada a lo largo de cada una de las fases del ciclo, juegan un papel central un grupo de serín-treonín quinasas llamadas Cdks (quinasas dependientes de Ciclinas) (Morgan, 1997). La activación de estas subunidades catalíticas pasa principalmente por su asociación con unas proteínas reguladoras llamadas Ciclinas, cuyos niveles de expresión, a diferencia de los de las Cdks, fluctúan a lo largo del ciclo (Sherr y Roberts, 2004). Gracias a estas variaciones en la concentración de las Ciclinas, se consigue una activación secuencial de cada uno de estos complejos heterodiméricos Cdk-Ciclina, clave para un avance ordenado a lo largo del ciclo.

Aunque existen otros muchos mecanismos reguladores de la actividad quinasa, todos ellos han sido concebidos para generar cambios rápidos y persistentes en dicha actividad por procesos de retroalimentación capaces de producir estos cambios una vez se haya alcanzado un cierto umbral crítico. Simplificando podríamos considerar el ciclo celular como el producto de un programa de activaciones e inactivaciones súbitas de las Cdks que aseguraran el avance unidireccional del proceso.

La célula puede detener su proliferación si detecta cualquier tipo de irregularidad que amenace su integridad. Para ello existen a lo largo del ciclo puntos de control o “checkpoints” que impiden a la célula entrar en una nueva fase del ciclo si la anterior no se ha completado correctamente (Hartwell y Weinert, 1989). Son los mismos mecanismos de control que propician la progresión a lo largo del ciclo, los que también participan en su bloqueo.

### 1.1 Salida de quiescencia y progresión por la fase G1 del ciclo

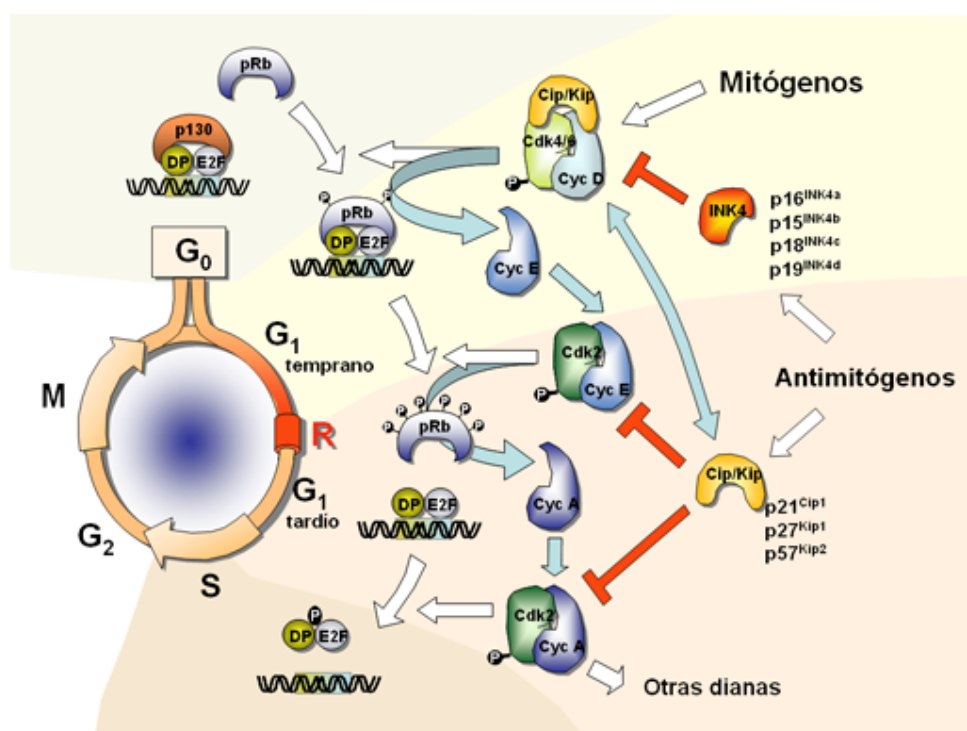
Con la excepción de aquellas células que han alcanzado un estadio de diferenciación terminal, bajo ciertos estímulos, el resto de tipos celulares pueden abandonar ese estado y entrar en el ciclo de división celular. Los estímulos proceden del medio extracelular y entre estos se incluye la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento. Las Ciclinas que actúan en G1 integran la información que llega al medio intracelular para dirigir la entrada y progresión del ciclo a lo largo de la fase G1. La pieza clave de la maquinaria que reanuda el ciclo son las tres Ciclinas de la familia D (D1, D2 y D3), que se unen regulando de forma alostérica a sus respectivas Cdks, Cdk4 y Cdk6. Las dos Ciclinas de la familia E (E1 y E2), que de la misma forma gobiernan la actividad de su subunidad catalítica, Cdk2 (Sherr, 1996; Sherr y Roberts, 2004; Jones y Kazlauskas 2001) tienen así mismo una gran importancia en el desarrollo de la fase G1. (fig. 1).

Ante una adecuada estimulación mitogénica, se ponen en marcha distintas rutas de señalización celular que promueven la activación de los complejos Cdk4,6-Ciclina D a distintos niveles: transcripción génica, traducción y estabilización de la Ciclina D, ensamblaje de las Ciclinas D con sus respectivas Cdks e importe de estas holoenzimas al núcleo donde llevan a cabo la fosforilación de sus sustratos (Sherr y Roberts, 1999). Así, por un lado, la activación mitogénica de la ruta Ras/Raf/Mek/Erk eleva considerablemente los niveles del ARNm de la Ciclina D1 (Lavoie *et al.*, 1996; Balmanno *et al.*, 1999; Peeper *et al.*, 1997; Kerkhoff *et al.*, 1997; Aktas *et al.*, 1997). Por otro, y de forma simultánea, la puesta en marcha de la ruta PI3K/Akt prolonga la vida media de la Ciclina D1 inhibiendo su fosforilación en el residuo T286 catalizada por la quinasa GSK3 $\beta$  que promueve su ubiquitinación y degradación por la ruta del proteosoma.

Una vez la célula abandone la fase G1 del ciclo, la actividad de los complejos Cdk4,6-Ciclina D no volverá a ser necesaria hasta que, llegado el caso, la célula inicie una nueva ronda de división reentrando en la siguiente fase G1 (Matsushime *et al.*, 1991). En ciclos de división continua, aunque la degradación de Ciclina D1 fuera de G1 es intensa, la síntesis promovida por Ras y la estabilización en G2 permiten su reacumulación antes de que finalice la división celular, de modo que el segundo ciclo se acorta con respecto al primero (Guo *et al.*, 2002). Por el contrario, una retirada de mitógenos o exposición a agentes antiproliferativos como TGF $\beta$ , frenaría la síntesis de Ciclina D1 e incrementaría su degradación, conduciendo a una caída brusca de la actividad quinasa que terminaría devolviendo a la célula a su estado inicial de reposo.

Otra forma de neutralizar una actividad quinasa indeseada, se realiza a través de la interacción de los complejos Cdk-Ciclina con moléculas inhibitoras de las familias INK4 y CIP/KIP (Sherr y Roberts,

1995; Sherr y Roberts, 1999) (fig.2 y 3). La familia INK4 incluye a cuatro miembros: p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup> los cuales, mediante competición alostérica con la Ciclina D por la unión a Cdk4/6, bloquean específicamente la formación y activación de estos complejos (Pavletich, 1999). La senescencia, el estrés oncogénico, la diferenciación y diversas señales antimitogénicas promueven la acción de estas moléculas inhibitorias. La familia de inhibidores Cip/Kip, está integrada por tres proteínas: p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup> (Sherr y Roberts, 1999; Sherr, 2000; Nakayama y Nakayama, 1998). Esta familia inhibe al complejo Cdk-Ciclina y su espectro de acción no se limita a los heterodímeros cdk4,6-Ciclina D, sino también a los integrados por las otras Cdks como Cdk1 y Cdk2. Aunque su acción es inhibitoria sobre estos últimos, el efecto que pueden tener sobre los pares Cdk4/6-Ciclina D, puede ser en ciertas circunstancias activador, aspecto que analizaremos con mayor profundidad más adelante.



**Figura 2. Esquema general de los principales eventos necesarios para la transición desde quiescencia hasta G1/S.** La llegada de mitógenos a la célula conlleva la expresión de Ciclinas D que se unen a Cdk4 y/o Cdk6 iniciando la fosforilación de Rb que conlleva su inactivación parcial. Esta inactivación parcial de Rb redundará en la liberación de los factores de transcripción E2F que permitirán la expresión de la Ciclina E que uniéndose a Cdk2 continuará fosforilando a Rb en sitios adicionales, de tal forma que se permite la expresión de Ciclina A que se unirá a Cdk2 para permitir el paso por la fase S del ciclo. Las señales antimitogénicas redundan en la expresión de los inhibidores INK4 que inactivarán a las Cdks y Cip/Kip que inactivarán los complejos Cdk-Ciclina.

Durante la fase G1, además de promoverse la síntesis y estabilidad de la Ciclina D, se produce también un descenso significativo en los niveles de expresión del inhibidor p27<sup>kip1</sup>. En esta disminución dependiente de mitógenos participa la ruta de PI3K/Akt que inhibe la síntesis transcripcional de p27<sup>kip1</sup> a través de la fosforilación de distintos miembros de la familia forkhead de factores de transcripción. A este descenso también contribuye y de forma mucho más significativa, la intensa

degradación proteolítica promovida, principalmente, por la ubiquitín ligasa KPC (Kamura *et al.*, 2004) en un proceso que, a diferencia del que tendrá lugar durante la transición G1/S, no parece depender ni de la fosforilación en el residuo T187 de p27 ni de la ubiquitín ligasa SCF (Hara *et al.*, 2001).

Aprovechando la todavía reducida actividad quinasa que opera en los primeros momentos de la fase G1, los complejos prereplicativos que empezaron a ensamblarse al final de la mitosis, completan su formación. Así en una secuencia ordenada de interacciones que implica, por este orden, a las proteínas ORC, Cdc6 y Cdt1, y MCM, las regiones cromáticas de los orígenes de replicación del ADN adquieren la potencialidad de replicarse a falta de su activación final (Bell y Dutta, 2002). La participación de las Cdk, o al menos de sus Ciclinas asociadas, parece ser decisiva en la salida de quiescencia como analizaremos en próximos apartados (Bell y Dutta, 2002; Geng *et al.*, 2007; Zhang, 2007).

## 1.2 La transición G1/S

A medida que, en respuesta a señales mitogénicas, se van incrementando los niveles de los complejos Cdk4,6-Ciclina D, comienza la fosforilación de distintos sustratos cuya modificación postraduccional es fundamental para la salida de G1. Una de estas dianas es la familia de proteínas del retinoblastoma (a la que llamaremos genéricamente Rb) que comprende tres miembros: Rb, p107 y p130 (Ewen *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993) (fig.2 y 3). Esta familia de proteínas regula la actividad de una serie de factores de transcripción denominados E2F (Dyson, 1998) de los que depende la expresión de toda una batería de genes cuyos productos son necesarios, entre otras cosas, para la entrada en la fase S (fig.2 y 3). En su forma hipofosforilada y activa, Rb se encuentra interaccionando y bloqueando la actividad transactivadora de los factores E2F a la vez que recluta también diversas moléculas represoras, como histondeacetilasas (HDAC) (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998) y complejos implicados en la remodelación de la cromatina (SWI/SNIF) (Zhang *et al.*, 2000), posicionándolos sobre las regiones promotoras de los genes controlados por E2F (fig. 2 y 3). Se ha visto que, sin estos componentes adicionales, la función represora de Rb no es del todo completa (Zhang *et al.*, 2000). Así, en células con baja actividad HDAC o SWI/SNIF, la sobreexpresión de Rb o de un mutante no fosforilable, no conduce a la consabida parada del ciclo en G1 que sí se produce con la reintroducción de las moléculas ausentes.

Este macrocomplejo represor al ser fosforilado por los complejos Cdk4,6-Ciclina D se disocia parcialmente, perdiendo actividad HDAC a la vez que disminuye ligeramente su afinidad de interacción con E2F (Harbour *et al.*, 1999). Este hecho permite el inicio de la expresión de la segunda Ciclina de G1, Ciclina E (fig.2 y 3), cuyos niveles de actividad quinasa, tras la asociación con su respectiva Cdk, Cdk2 (Koff *et al.*, 1992; Dulic *et al.*, 1992), empiezan a elevarse progresivamente gracias a la concurrencia de varios procesos, en su mayoría, de retroalimentación positiva:

### 1.2.1 Movilización de inhibidores Cip/kip y segundo descenso en los niveles de p27<sup>Kip1</sup>

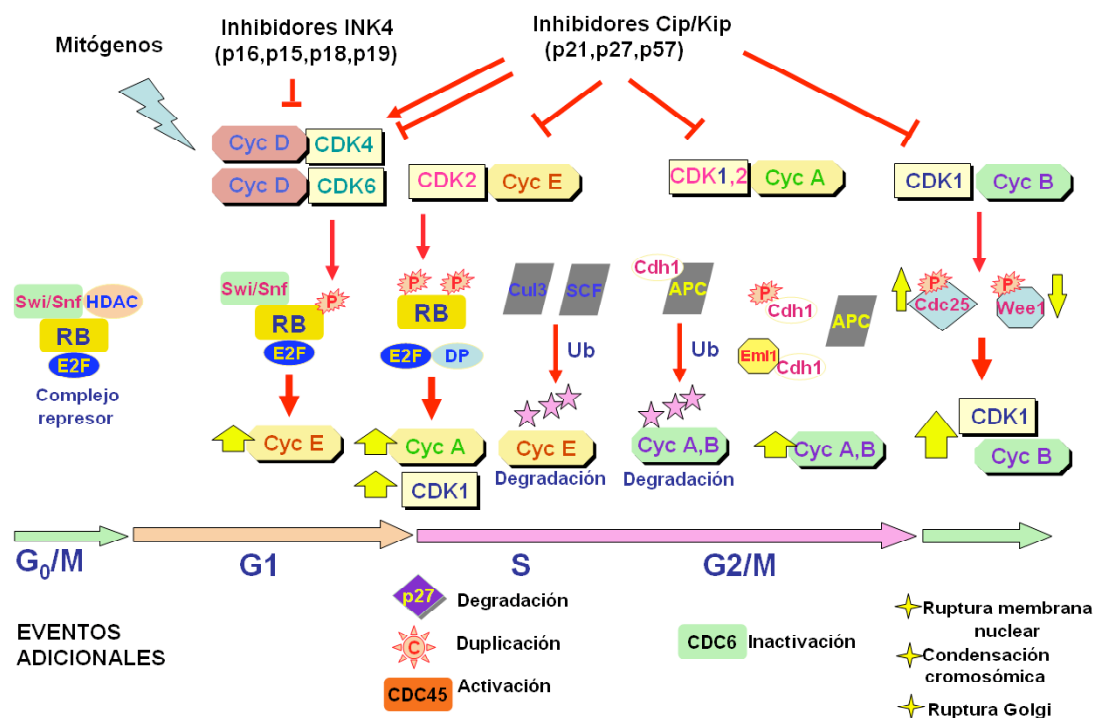
En primer lugar, la incipiente actividad Ciclina E, fosforilaría p27<sup>kip1</sup> en el residuo T187 (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997), que es reconocido por la ligasa SCFskp2. Así, esta forma fosforilada de p27<sup>kip1</sup> será poliubiquitinada y posteriormente degradada por la ruta del proteosoma (Elledge y Harper 1998; Bloom y Pagano 2003; Nakayama *et al.*, 2001). La eliminación del inhibidor favorecería un aumento cada vez mayor de la actividad Ciclina E que intensificaría la degradación proteolítica de p27<sup>kip1</sup> y amplificaría el efecto activador sobre los complejos Cdk2-Ciclina E. Por otro lado, los complejos Cdk4,6-Ciclina D son capaces de retirar del medio a los inhibidores de la familia Cip/kip, entre ellos p27<sup>kip1</sup>, contribuyendo indirectamente a la activación de los dímeros Cdk2-Ciclina E sin restar actividad a los complejos Cdk4/6-Ciclina D. Bajo estimulación mitogénica, p27<sup>kip1</sup> es fosforilado en las tirosinas 88 y 89 por Abl y Lyn de modo que aunque se una al complejo Cdk4/6-Ciclina D en lugar de inhibir su actividad quinasa, permite que p27<sup>kip1</sup> funcione como un factor de ensamblaje, aumentando la estabilidad del complejo Cdk4/6-Ciclina D (Grimmler *et al.*, 2007)

### 1.2.2 Inactivación de Rb

Existen 16 sitios potencialmente fosforilables por Rb, habiéndose detectado la mayoría de ellos *in vivo*. Steven Zhang y otros (2000) demostraron que la fosforilación de Rb por Cdk4-Ciclina D duante G1 evita la interacción de HDAC con el complejo pRB-E2F-SWI/SNF, lo que permite la expresión de ciclina E. Sin embargo, Cdk4-Ciclina D no puede romper este último pRB-E2F-SWI/SNF y sí Cdk2-Ciclina E, en G1 tardío. Mediante la fosforilación de pRB y SWI/SNF se permitirá la expresión de Ciclina A y cdc2. Existe una fosforilación diferencial de sitios de Rb por los distintos complejos Cdk-Ciclina que conlleva diferentes efectos. De este modo, el residuo Ser780 de Rb es fosforilado por Cdk4-Ciclina D en los primeros estadios del ciclo. Los residuos Ser807 y Ser811 son fosforilados igualmente por Cdk4-Ciclina D y sin embargo el residuo Ser608 es fosforilado justo antes de la entrada en fase S y es sustrato tanto de Cdk4-Ciclina D como de Cdk2-Ciclina A pero no por Cdk2-Ciclina E (Zarkowska *et al.*, 1997) Del mismo modo, Thr821 es sustrato de Cdk2-Ciclina A. Los incipientes complejos Cdk2-Ciclina E, al igual que Cdk4,6-Ciclina D son también capaces de fosforilar Rb aunque, preferentemente, en sitios distintos (Zarkowska y Mitnacht 1997; Kitagawa *et al.* 1996). Esta segunda ronda de fosforilaciones completaría la inactivación de Rb que dejaría de interaccionar con los represores SWI/SNIF a la vez que bloquearía definitivamente su unión con los factores E2F (fig.2 y 3). Éstos activarían el programa transcripcional de un gran número de genes entre los que se encuentran los propios factores E2F y la Ciclina E (Sherr 1996; Degregori *et al.*, 1995; Soucek *et al.*, 1997). De este modo, la síntesis de Ciclina E, al retroalimentarse positivamente, dejaría de depender de las distintas cascadas de señalización celular activadas en respuesta a señales mitogénicas, y pasaría a depender de su creciente actividad quinasa acumulada.

Gracias a estos mecanismos de retroalimentación positiva, el sistema de control del ciclo celular se convierte en un proceso autónomo, independiente de la activación mitogénica. Es entonces cuando la célula alcanzaría un punto de no retorno que la obligaría irreversiblemente a dividirse. Superado este estadio, denominado punto de restricción, la progresión celular continúa aún en ausencia de estímulos

extracelulares (factores de crecimiento, nutrientes, interacción célula-célula...) que, hasta ese momento, se habían erigido como determinantes (Pardee 1989; Sherr 1994). La actividad Ciclina D, cuyo principal cometido habría consistido en propiciar la síntesis autosuficiente de Ciclina E a través de la fosforilación incipiente de Rb, se convierte en prescindible.



**Figura 3. Mecanismo molecular que gobierna el ciclo celular.** La activación de los complejos Cdk4/6-Ciclina D en respuesta a estímulos mitogénicos conduce a una inhibición parcial de Rb que será completada por los dímeros Cdk2-Ciclina E, los cuales regulan también la actividad de numerosos sustratos necesarios para la transición G1/S del ciclo celular (p27, Cdc45, proteínas centrosomales...). La inactivación de Rb permite la formación de nuevos heterodímeros Cdk-Ciclina, Cdk1-Ciclina A primero y Cdk1-Ciclina B después, responsables del tránsito celular a lo largo de las fases S y G2/M del ciclo.

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

En este escenario molecular de elevada actividad E2F, actividad Cdk creciente y altos niveles de Rb fosforilado, la célula prosigue su avance a través del ciclo celular y entra en la fase S. Durante este periodo, se inicia la duplicación centriolar, que se prolongará durante la fase G2 y se producirá la replicación del contenido genético. Al mismo tiempo, los complejos prereplicativos, se activan en parte por su asociación con factores de replicación adicionales como Cdc45 y GINS. Las Cdks disparan entonces el desensamblaje de los complejos pre-replicativos fosforilando a Cdc6 y Cdt1 bloqueando la formación de novo de pre-RC durante S y G2, asegurándose así una única ronda de replicación del DNA por ciclo.

Desde un punto de vista bioquímico, los niveles de Ciclina E empiezan a decaer fundamentalmente por su degradación proteolítica (fig.3). Se han identificado dos rutas implicadas en este proceso dependientes del sistema ubiquitinación - proteosoma. Por un lado, la ubiquitin ligasa



Cul3 es capaz de dirigir la destrucción de monómeros de Ciclina E, no asociados a Cdk2, con independencia del estado de fosforilación de la Ciclina (Clurman *et al.*, 1996; Singer *et al.*, 1999). Una segunda ubiquitin ligasa, SCF, conjugada con la proteína F-box, Cdc4 (también designada como Fbw7 y Ago), contribuye igualmente a la degradación proteolítica de la Ciclina por la vía del proteosoma (Koepp *et al.*, 2001;). Esta segunda ruta precisa de la fosforilación de diferentes residuos localizados en el seno de la propia Ciclina, necesarios para que su interacción con Cdc4, libre o unida a Cdk2, sea posible y pueda de este modo ser ubiquitinada.

El lugar dejado por la Ciclina E empieza a ser ocupado por una nueva familia de Ciclinas, las de tipo A (A1 y A2), capaces de asociarse a las quinasas Cdk2 y Cdk1 para formar complejos activos (Girad *et al.*, 1991) (fig.2). En el creciente y progresivo aumento de los niveles de expresión de la Ciclina A, participa una proteína denominada Emi1. Este polipéptido es capaz de asociarse a las moléculas adaptadoras Cdh1 y Cdc20 (Hsu *et al.*, 2002) bloqueando su interacción activadora con el macrocomplejo APC, ubiquitin ligasa que participa mayoritariamente en la degradación de las Ciclinas mitóticas A y B (fig.3). Ciclina B sucede a la Ciclina A, presente hasta la transición G2/M, e interacciona únicamente con Cdk1. Aunque Ciclina B está presente desde las fases S y G2 del ciclo, no es hasta la transición G2/M cuando se vuelve activa (Pines y Hunter 1992). La pérdida de fosforilaciones inhibitoras (Izumi *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1993) y su translocación al núcleo por inactivación de una secuencia de retención citoplasmática (Li *et al.* 1997) permiten a la incipiente asociación Ciclina B-Cdk1 empezar a fosforilar un amplio número de sustratos (Malumbres y Barbacid 2005). La ruptura de la membrana nuclear, la condensación cromosómica y la formación del huso acromático, son algunos ejemplos de procesos con implicación directa de la Ciclina B (Malumbres y Barbacid 2005) (fig.3). Finalmente, la activación de APC en la transición metafase-anafase promueve el descenso de los niveles de Ciclina B y el decaimiento progresivo de su actividad quinasa asociada, necesarios para la salida de mitosis (King *et al.* 1996; Harper *et al.*, 2002). En este contexto la célula, dependiendo de las condiciones extracelulares, afrontará el inicio de un nuevo ciclo de división mitótica o por el contrario optará por entrar en una fase de reposo o quiescencia.

## 2 CICLINAS DEPENDIENTES DE QUINASAS

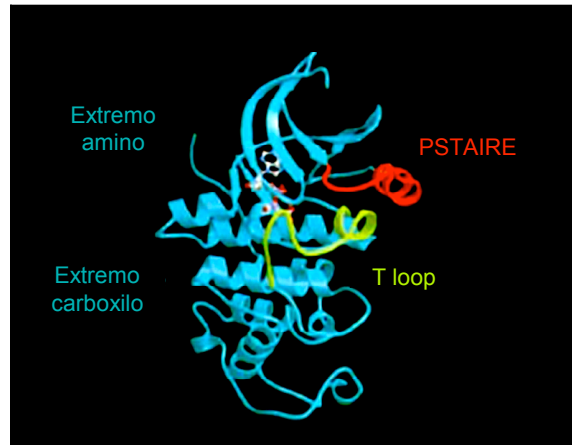
### 2.1 Estructura de las Cdks

Las Cdks se definen como subunidades catalíticas con actividad serín-treonín quinasa que presentan una alta homología de secuencia (35-65%) con los prototipos Cdc2/Cdc28 de levaduras y que son capaces de unirse a subunidades reguladoras llamadas Ciclinas (Malumbres y Barbacid, 2005; Vand den Heuvel y Harlow, 1993).

Como modelo estructural de Cdks analizaremos la estructura de Cdk2 que ha sido cristalizada en diferentes formas. Sus principales características estructurales son extrapolables a otras Cdks (De Bondt *et al.*, 1993; Morgan 1996). Como la mayoría de las proteínas quinasas, Cdk2 presenta un pequeño lóbulo amino-terminal que contiene una estructura en lámina  $\beta$  y el dominio PSTAIRE (conservado en todas las Cdks de distintos organismos) con estructura en  $\alpha$  hélice, y un lóbulo carboxilo terminal de

mayor tamaño donde predomina fundamentalmente la conformación helicoidal (fig. 4). El ATP se encaja en el surco delimitado por ambos lóbulos. 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, conservado en todas las Cdk (Meyerson *et al.*, 1992; Hanks *et al* 1988), dirigen el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la proteína sustrato sobre el fosfato  $\gamma$  del ATP. En un estado conformacionalmente inactivo de la Cdk, el bloqueo del acceso 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 fosfato del ATP (por el posicionamiento del dominio PSTAIRE), impiden que se produzca de forma eficiente la reacción de fosfotransferencia.

**Figura 4. Estructura tridimensional de Cdk2.** Se destaca el dominio PSTAIRE, característico de las Cdk, así como el dominio implicado en la regulación de su actividad catalítica, T-loop.

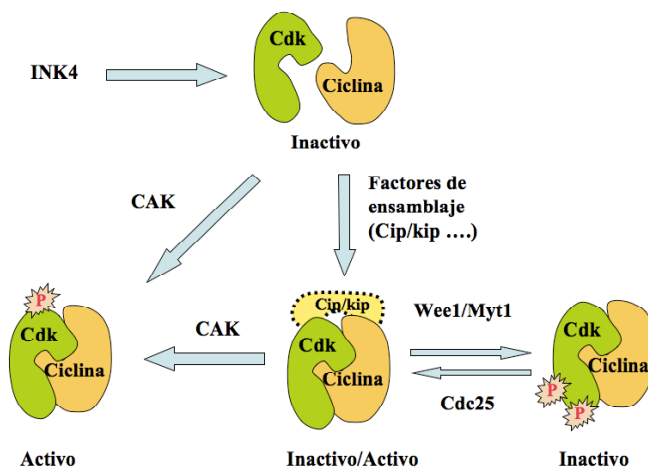


## 2.2 Regulación de las Cdk

Se han descrito 2 mecanismos importantes de regulación de la actividad Cdk (fig. 5):

1. Interacción proteína-proteína; Bien por su asociación con Ciclinas o bien por su unión a moléculas inhibitorias
2. Modificaciones postraduccionales: Mediante fosforilaciones activadoras o inhibitoras

Así mismo, la localización subcelular de los complejos Cdk-Ciclina es otro mecanismo importante de regulación



**Figura 5. Mecanismos implicados en la regulación de la actividad Cdk.** Para que una Cdk sea completamente activa debe estar unida a su Ciclina, fosforilada en su T-loop (CAK), defosforilada en thr14 y tyr15 (Cdc25) y no unir ninguno de los inhibidores INK4 ni Cip/Kip. Todos estos eventos, que están sujetos a regulación celular, permiten un control estricto y una regulación fina de la progresión por el ciclo celular

### 2.2.1 Asociación con Ciclinas

Ya hemos mencionado que la activación de las Cdk requiere, entre otras cosas, la unión con sus respectivas Ciclinas. La disponibilidad de éstas, también se encuentra regulada a dos niveles: transcripción y degradación

Las Ciclinas son proteínas de peso molecular variable, entre 30 y 90 kD, capaces de interactuar y activar una o más Cdk. La homología de secuencia entre las distintas Ciclinas se concentra en una región de 100 aminoácidos, conocida como cyclin box, necesaria para la unión a las Cdk (Kobayashi *et al.* 1992; Lees y Harlow 1993).

Como consecuencia de las interacciones con su Ciclina, se producen diversos cambios en la conformación del centro activo de la Cdk que conducen a una elevación de su actividad catalítica. El más obvio de estos cambios se produce en el T-loop, que deja de ocluir el sitio de unión de la proteína sustrato adoptando una forma aplanada en la entrada del surco. De este modo el residuo Thr 160 queda expuesto al exterior y es susceptible de ser fosforilado por el complejo CAK (quinasa activadora de las Cdk). Otro cambio más acusado si cabe, tiene lugar en el sitio de unión al ATP, donde el cambio posicional que sufre el dominio PSTAIRE conduce a la reorientación de diversos residuos que posibilitan una correcta alineación de los grupos fosfatos del ATP. Si bien muchos de estos cambios estructurales pueden considerarse representativos de las interacciones Cdk-Ciclina, otros son propios de cada complejo, lo que explicaría parcialmente la especificidad de sustrato que confiere la subunidad reguladora a la subunidad catalítica. Por otro lado, la fosforilación de Cdk1 en su T-loop también sirve para aumentar la afinidad y la fortaleza por Ciclina A (Desai *et al.*, 1995).

La fortaleza de la interacción Cdk-Ciclina, varía de unos complejos a otros. Mientras que en algunos casos, veáse Cdk1-Ciclina B, Cdk2-Ciclina A y Cdk2-Ciclina E, la interacción Cdk-Ciclina es lo suficientemente fuerte como para no precisar de ayudas adicionales (Desai *et al.* 1995), en la formación de otros pares Cdk-Ciclina se requiere la intervención de factores de ensamblaje, (fig. 5) caso de los complejos Cdk4-Ciclina D y Cdk7-Ciclina H. Recientemente se han publicado varios trabajos en los que se describe el modo en el que gracias a la fosforilación de p27<sup>kip1</sup> en las tirosinas 88 y 89 por las quinasas Abl y Lyn. (Grimmler *et al.*, 2007; James *et al.*, 2008), su unión al complejo Cdk4/6-Ciclina D en lugar de inhibir su actividad quinasa, aumenta la estabilidad de este. De esta manera se tiene un pool de complejos Cdk4-Ciclina D formados aunque inhibidos por p27<sup>kip1</sup>, de tal modo que en cuanto llegan a la célula factores mitogénicos, estos complejos pasan a su estado activo rápidamente.

### 2.2.2 Interacción con moléculas inhibidoras

De los inhibidores de la familia INK4 se sabe que compiten con las Ciclinas D por su unión a Cdk4 y Cdk6 interfiriendo en la formación de los complejos. Se ha visto, por estudios cristalográficos, que la unión de p16 a Cdk6, aunque no llegaría a solaparse con el sitio de unión a las Ciclinas, causaría

una serie de cambios alostéricos que se propagarían por la estructura de la Cdk, modificando de tal modo la orientación del dominio PSTAIRE y de los lóbulos N y C-terminales, que la interacción con las Ciclinas se vería estéricamente bloqueada (Pavletich *et al.*, 1999).

Respecto a los inhibidores Cip/Kip, se ha identificado en su extremo N-terminal el dominio implicado en la interacción e inhibición de los pares Cdk-Ciclina. Se trata de una zona dividida en dos subregiones: una de menor tamaño que participaría en la unión a la Ciclina y otra de mayor extensión involucrada en la unión a la subunidad catalítica (Ball *et al.*, 1997; Fotedar *et al.*, 1996). La presencia de ATP en el centro catalítico interferiría con la acción de las moléculas Cip-Kip pero no impediría su unión al heterodímero a través del dominio de unión a Ciclinas que se produce con una afinidad muy alta. Esto podría explicar la existencia de complejos triméricos Cdk-Ciclina-Cip/Kip funcionalmente activos (LaBaer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1995; Soos *et al.*, 1996).

### **2.2.3 Modificaciones post-traduccionales**

#### **2.2.3.1 Fosforilación activadora**

Muchos complejos Cdk-Ciclina precisan ser fosforilados en un residuo Thr conservado del T-loop (Thr 160 en Cdk2) para adquirir una activación completa. Esta fosforilación es particularmente importante para los complejos Cdk1-Ciclina B, en los que la sola unión de la Ciclina no es del todo efectiva en términos de actividad quinasa, o también en el caso del par Cdk1-Ciclina A, donde la fosforilación contribuye en gran medida a la interacción entre ambas subunidades (Desai *et al.*, 1995). En el otro extremo encontramos complejos tales como Cdk5-p35 o incluso Cdk7-Ciclina H que no necesitan experimentar fosforilación alguna para ser funcionales (Fisher 2005). Los heterodímeros Cdk2-Ciclina A constituyen un caso intermedio. En estos, aunque el principal impacto en la actividad quinasa lo constituye la asociación de la Ciclina con la Cdk, tras la fosforilación se produce un incremento de actividad, de hasta 300 veces,

En eucariotas superiores la fosforilación de este residuo está catalizada por el complejo Cdk7-Ciclina H, también denominado CAK (fig. 5), cuyo ensamblaje requiere la participación del factor Mat-1, si bien la fosforilación en el dominio T-loop de Cdk7 también podría llegar a contribuir a la formación del complejo activo (Fisher, 2005).

#### **2.2.3.2 Fosforilación inhibitoria**

La mayoría de las Cdk que controlan el ciclo de división celular sufren fosforilaciones en el residuo Tyr 15 y dependiendo del organismo, también en Thr 14. Estos residuos, ocultos cuando las Cdk se encuentran libres, quedan expuestos y accesibles cuando las subunidades catalíticas se unen a sus respectivas Ciclinas. La presencia de grupos fosfato en estos aminoácidos reduce considerablemente, sino del todo, la actividad catalítica de los complejos al alterar muy posiblemente la orientación de los residuos críticos del centro activo o de los grupos fosfatos del ATP.

Estas fosforilaciones inhibitorias 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,

S y G2 básicamente, los complejos Cdk1-Ciclina B se mantienen silenciados gracias a fosforilaciones de los residuos Tyr 15 y Thr 14, catalizadas por las quinasas Wee1 y Myt1 (esta última sólo en eucariotas superiores) (Mueller *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997) (fig.5). La desfosforilación súbita causada por las fosfatasas de la familia Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C), conduce a la activación de Cdk1 y al comienzo de la mitosis (Ohi y Gould, 1999). A su vez, tanto las dos quinasas Wee1 y Myt1, como las fosfatasas Cdc25 están sujetas igualmente a fosforilaciones activadoras o inhibitoras (fig.3). En respuesta a un daño del material genético, la participación de las proteínas Chk1 y Chk2 fosforilando e inhibiendo las fosfatasas activadoras Cdc25 estabilizaría las fosforilaciones inhibitoras de Cdk1 impidiendo la entrada en mitosis y otorgando a la célula el tiempo necesario para corregir el daño y poder completar correctamente su ciclo de división (Dasika *et al.*, 1999; Zhou y Elledge 2000).

### 2.3 Modelos murinos deficientes en Cdks.

Gran parte de los datos presentados en los apartados anteriores han sido obtenidos a partir de estudios *in vitro* bien con proteínas purificadas, bien 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 realista 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. Existen diversas publicaciones que recopilan y revisan los diferentes modelos murinos transgénicos, KO y KI (del inglés Knock out y Knock in) que se han generado de las moléculas reguladoras del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2001; Ciemerych y Sicinski, 2005; Santamaría y Ortega, 2006; Aleem y Kaldis, 2006). Vamos a revisar a continuación aquellos modelos que poseen una implicación más directa con el trabajo descrito en esta memoria y que quedan resumidos en la tabla1.

Gen(es)	Supervivencia	Principal(es) fenotipo(s)	Referencia(s)
<b>Cdk2</b>	Viable	Esterilidad total en machos y hembras. Talla reducida	(Berthet <i>et al.</i> , 2003; Ortega <i>et al.</i> , 2003)
<b>Cdk4</b>	Viable	Talla reducida. Esterilidad masculina y femenina. Problemas proliferativos de células beta pancreáticas (diabetes). Proliferación reducida de las células de la pituitaria anterior.	(Rane <i>et al.</i> , 1999; Tsutsui <i>et al.</i> , 1999)
<b>Cdk6</b>	Viable	Hipoplasia tímica y esplénica. Defectos en hematopoyesis. Reducción de talla en hembras.	(Malumbres <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cdk4, Cdk6</b>	Letal desde E14.5	Hematopoyesis defectiva con leucemia megaloblástica severa. Reducción de talla	(Malumbres <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cdk2, Cdk6</b>	Viable	Mismo fenotipo que la suma de los "knock out" sencillos	(Malumbres <i>et al.</i> , 2004)

**Tabla1. Resumen de los principales fenotipos de los modelos knock out existentes para quinasas dependientes de Ciclinas.** La mayoría de los tejidos embrionarios es capaz de proliferar normalmente con tan solo una Cdk de interfase.

### 2.3.1 Modelos deficientes en Cdk4

Mediante técnicas de recombinación homóloga se han generado dos modelos KO murinos para estudiar la función de Cdk4 in vivo. En uno de estos modelos (Latres *et al.*, 1999) se insertó un casete de resistencia a Neomicina 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 el otro modelo (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 previamente 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.

### 2.3.2 Modelos deficientes en Cdk6

Al igual que en el caso de Cdk4, el modelo KO de Cdk6 (Malumbres *et al.*, 2004) era viable. 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 (Malumbres *et al.*, 2004).

### 2.3.3 Modelos con deficiencia doble 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.

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 (tabla2). 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 b (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 E16.5. 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).

#### 2.3.4 Modelos deficientes en Cdk2

Al igual que en el caso de Cdk4, para Cdk2 se han generado dos modelos deficientes en esta quinasa (Ortega *et al.*, 2003; Berthet *et al.*, 2003). 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 defectivos de Cdk2 (tanto machos como hembras) 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 (Ortega *et al.*, 2003).

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 (tabla2). 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 quinasa 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 sus ciclos de endo-replicación. Mediante complementación tetraploide, estos animales completan el desarrollo de modo análogo al knock out de Cdk2.

### 2.3.5 Modelos con doble deficiencia en 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 esencial en el avance a través de las distintas etapas del ciclo celular.

Gen(es)	Supervivencia	Principal(es) fenotipo(s)	Referencia
<b>CiclinaA1</b>	Viable	Infertilidad masculina	(Liu <i>et al.</i> , 1998)
<b>CiclinaA2</b>	Letal	Desarrollo inicial normal con muerte día 5.5pc tras depleción de pools maternos	(Murphy <i>et al.</i> , 1997)
<b>CiclinaB1</b>	Letal	Mortalidad a estadios muy tempranos de desarrollo	(Brandeis <i>et al.</i> , 1998)
<b>CiclinaB2</b>	Viable	Sin defectos aparentes	(Brandeis <i>et al.</i> , 1998)
<b>CiclinaB3</b>	No realizado		
<b>CiclinaD1,D2 y D3</b>	Letal E16.5	Problemas hematopoyéticos	(Kozar <i>et al.</i> , 2004)
<b>CiclinaE1</b>	Viable	Sin defectos aparentes	(Geng <i>et al.</i> , 2003)
<b>CiclinaE2</b>	Viable	Fertilidad masculina reducida	(Geng <i>et al.</i> , 2003)
<b>CiclinaE1 y E2</b>	Letal E11.5	No endoreplicación de trofoblastos gigantes. Los MEFs proliferan pero no son capaces de entrar en ciclo desde G0.	(Geng <i>et al.</i> , 2003)

**Tabla2. Resumen de los principales fenotipos de los modelos knock out existentes para Ciclinas.** Los fenotipos son muy parecidos a los knock out de sus subunidades catalíticas.

### 2.3.6 Análisis de fibroblastos embrionarios procedentes de modelos murinos deficientes en Cdks

El establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de fibroblastos embrionarios (MEFs del inglés Mouse Embryonic Fibroblasts) ha permitido una caracterización más precisa del papel que desarrollan las Cdks en la proliferación y ciclo celular.

Si bien alguno de los animales KO para Cdks no eran capaces de completar el desarrollo embrionario como el doble KO Cdk4/6, lo cierto es que *in vitro*, los MEFs procedentes de todas las estirpes KO descritas en el presente trabajo, son capaces de proliferar (tabla3). Lo que confirma que esas Cdks son prescindibles para un normal desarrollo del ciclo celular, salvo en unos pocos tipos celulares.

Así los MEFs KO para Cdk4 son capaces de dividirse sin mayores problemas, si bien presentan un retraso de 3-6 horas en la entrada en fase S y son parcialmente resistentes a la transformación con Ras



más un dominante negativo de p53 (Tsutsui *et al.*, 1999). Los MEFs deficientes en Cdk6 o en Cdk2 no presentan ninguna diferencia proliferativa con respecto a los MEFs silvestres (Ortega *et al.*, 2002; Malumbres *et al.*, 2004) salvo una ligera menor eficiencia de entrada en S de los MEFs KO para Cdk2, así como una tendencia a la transformación con Ras+E1A un 30% inferior. Del mismo modo, los MEFs dobles KO para Cdk4 y Cdk6 tienen cinéticas de proliferación algo menos eficientes que los silvestres, si bien se immortalizan con normalidad (Malumbres *et al.* 2004).

Los MEFs KO para las distintas Ciclinas se comportan al igual que los KO para las Cdks con escaso fenotipo. La única diferencia relevante es que si bien los MEFs KO en Cdk2 entran eficientemente en S desde quiescencia, los MEFs doble KO para Ciclina E1 y Ciclina E2 no son capaces de reentrar en ciclo desde quiescencia, debido a un fallo a la hora de cargar y activar las proteínas MCM en los orígenes de replicación (Geng *et al.*,2003).

Gen(es)	Principal(es) fenotipo(s)	Referencia(s)
<b>Cdk2</b>	Proliferan con normalidad y se immortalizan con eficiencia del 66%. P4 proliferan menos Entrada en S normal P4 ligeramente menos eficiente Se transforman con Ras+E1A pero con 30% de menor eficiencia	(Berthet <i>et al.</i> ,2003; Ortega <i>et al.</i> , 2003)
<b>Cdk4</b>	Proliferan y se immortalizan con normalidad Entrada con retraso y menor eficiencia en S Resistentes a transformación con Ras + DNp53	(Rane <i>et al.</i> ,1999; Tsutsui <i>et al.</i> , 1999)
<b>Cdk6</b>	Proliferan y se immortalizan con normalidad	(Malumbres <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cdk4,Cdk6</b>	Menor proliferación. Se immortalizan con normalidad Entrada con menor eficiencia en S Resistentes a transformación con Ras + DNp53	(Malumbres <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cdk2,Cdk6</b>	No descrito	(Malumbres <i>et al.</i> , 2004)

**Tabla3. Resumen de los principales fenotipos de los fibroblastos embrionarios (MEFs) procedentes de modelos knock out para quinasas dependientes de Ciclinas.** Una sola Cdk de interfase es capaz de desarrollar el ciclo *in vitro* casi con igual eficiencia que con la dotación completa de Cdks

### 3 RESPUESTA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN

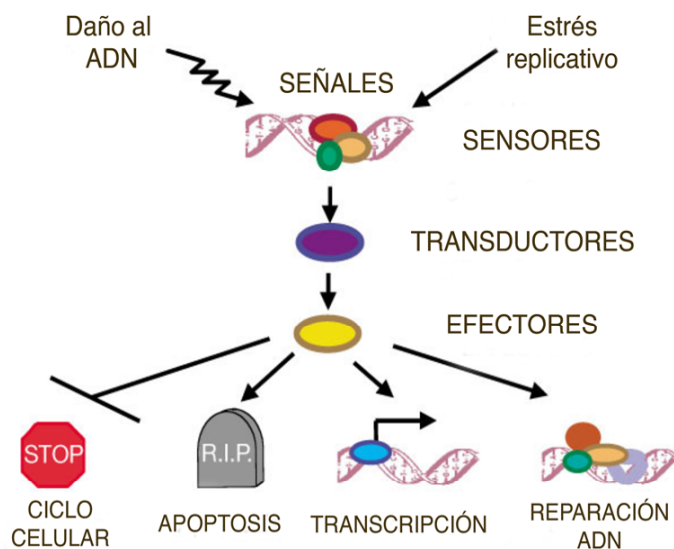
La supervivencia de los organismos depende de que su información genética se transmita con precisión de una célula a sus células hijas. Para que se produzca una transmisión fidedigna, no sólo se requiere un sistema preciso de replicación del ADN. También es imprescindible sobrevivir a los daños que se inducen al ADN de forma espontánea y minimizar el número de mutaciones que se transmiten a la descendencia. Con este fin, las células han desarrollado mecanismos para supervisar la estructura cromosómica y coordinar los procesos de reparación y progresión en el ciclo celular.

Los puntos de control (o Checkpoints) de daño al ADN se definieron inicialmente como rutas de regulación no esenciales que controlan la capacidad de las células para arrestar el ciclo celular en respuesta a daño al ADN, dando tiempo para que se repare. Sin embargo, las últimas evidencias sugieren que esta definición histórica del Checkpoint es insuficiente para explicar la función de esta ruta. Además de controlar el arresto del ciclo celular, estas rutas se ha demostrado que controlan la activación de las vías de reparación del ADN, la composición de la cromatina telomérica y el reclutamiento de las proteínas de reparación del ADN a los lugares del daño (Zhou y Elledge, 2000).

### 3.1 Organización general de las rutas de respuesta frente al daño en el ADN

La respuesta a daño al ADN (DDR, del inglés DNA Damage Response) se puede esquematizar como una ruta de transducción de señales que se compone de sensores, transductores y efectores (fig.6). Aunque nos referimos a ello como una ruta, es más preciso hablar de una red de rutas que interaccionan para ejecutar una respuesta. Si bien, las identidades de los sensores se están caracterizando actualmente, se sabe más acerca de los transductores de señal, estos se componen de cuatro tipos de proteínas conservadas que contienen motivos reconocibles. Una clase se constituye por proteínas relacionadas con fosfo-inositido kinasas (PIK) que incluyen a ATM (por Ataxia Telangiectasia Mutated) y ATM-Rad3-related (ATR) en mamíferos y sus homólogos en levaduras. Estas proteínas forman el núcleo de toda la respuesta a daño al ADN. Por debajo de estas proteínas se sitúan dos familias de quinasas de checkpoints (CHK) las quinasas Chk1 y Chk2. Estas quinasas desarrollan la respuesta frente al daño al DNA en mamíferos y son las dianas de ATM y ATR. El cuarto miembro de las proteínas transductoras de señal, son las proteínas que contienen repeticiones de tipo BRCT que incluyen a Rad9 en *Saccharomyces cerevisiae* y Crb2 en *Schizosaccharomyces pombe*. Estas proteínas no presentan homólogos claros en humanos, si bien BRCA1 y 53BP1 son posibles candidatos. La función de estas proteínas es la de reclutar substratos en respuesta a daño al ADN (Zhou y Elledge, 2000).

Por debajo de este nivel de transducción de señales se encuentran los efectores, que ejecutan las funciones de la DDR. Esto incluye a substratos de las quinasas PIK y CHK así como proteínas implicadas en reparación del ADN como BRCA1 y Nbs1, regulación de la transcripción como p53 y control del ciclo celular como Cdc25C (fig.6). Algunas de estas moléculas como BRCA1 pueden tener múltiples funciones en la ruta de transducción de señales (Zhou y Elledge 2000).



**Figura 6. Esquema general de la respuesta celular frente a daño al ADN.** El daño será identificado por proteínas sensoras que señalarán a través de transductores para que las proteínas efectoras paren el ciclo celular, estimulen la reparación del ADN y en caso de que el daño sea irreparable induzcan apoptosis. (Adaptado de Zhou y Elledge, 2000)

**3.1.1 Identificación del daño**

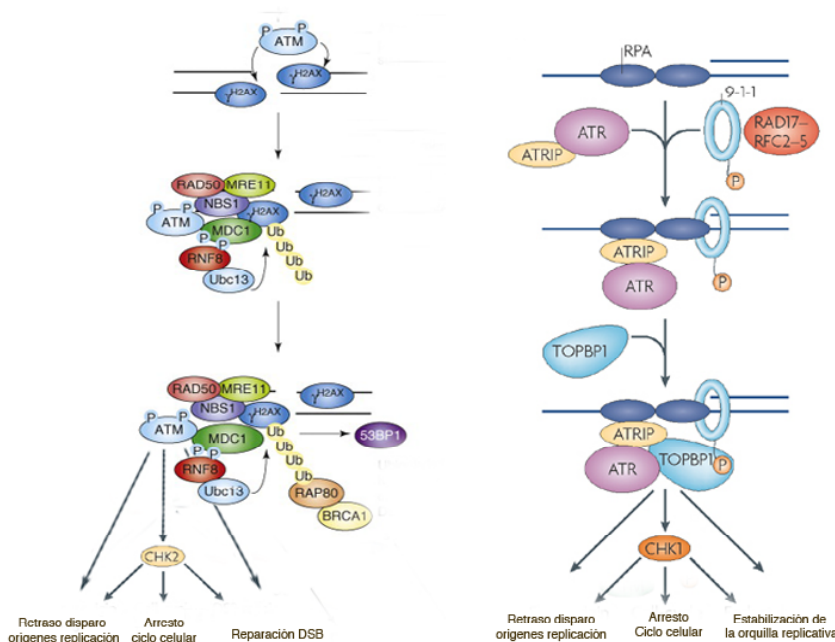
Para proteger adecuadamente el genoma, deben detectarse todo tipo de alteraciones estructurales, incluyendo nicks, huecos y roturas de doble cadena (DSBs) así como la multitud de alteraciones que bloquean la replicación del ADN. A continuación analizamos las más relevantes.

**3.1.1.1 Rotura de doble cadena**

El complejo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) es el sensor de roturas de cadena doble que recluta a ATM a las zonas dañadas (fig.7). ATM se encuentra como dímeros inactivos que, cuando son reclutados a los DSBs, se disocian y autofosforilan en múltiples residuos (como ser1981, ser367 y ser1893) que la mantiene activa. MRN es también sustrato de ATM y también es capaz de reclutar alguno de los sustratos de esta última. Otras proteínas que participan en la activación de ATM son Mdc1 que se une a ATM y a  $\gamma$ -H2AX acumulando eficientemente ATM en el DSB. ATMIN activa a ATM en respuesta a cambios conformacionales en la cromatina. No obstante, los detalles de varias partes de este proceso, incluido la desactivación de ATM, permanecen aun sin esclarecer completamente.

**3.1.1.2 Alteraciones que bloquean la replicación. ADN de cadena sencilla**

Cuando la ADN polimerasa se para como consecuencia de algún daño existente en el ADN, la helicasa replicativa, MCM continúa desencadenando el ADN por delante de la horquilla replicativa, generandose ADN de cadena sencilla (ssDNA) (fig.7). El ssDNA será reconocido por la proteína RPA (del inglés Replication Protein-A) que lo cubrirá. El complejo ssDNA-RPA desempeña dos funciones críticas; por un lado recluta a ATR mediante su subunidad reguladora ATRIP (Zou y Elledge, 2003) y por otra, recluta y activa a Rad17 que carga al complejo 911 (Rad9-Rad1-Hus1) en el ADN. Entonces ATR fosforilará a Rad17, a 911 y a TopBP1, lo que resulta en señalización del daño. La activación de ATR en respuesta a DSBs parece requerir de ATM (Jazayeri *et al.*, 2006; Cuadrado *et al.*, 2006).



**Figura 7. Esquema global de la señalización de daño y activación del Checkpoint frente a DSBs y roturas de una sola cadena.** El elemento central de ambas rutas consiste en la activación de ATM/ATR para que estas proteínas orquesten

la respuesta a daño. (Adaptado de Wood *et al.*, 2008)

### 3.1.2 Transductores

Los transductores son las proteínas que actúan en las rutas de señalización incluyendo a ATM, ATR y las que se encuentran por debajo de estas, como Chk1 y Chk2. Sus funciones son reclutar substratos adicionales y actuar como andamios que permitan el ensamblaje de los complejos.

En el lugar donde se produce la rotura de doble cadena, la histona H2AX resulta fosforilada en Ser139 por ATM, ATR y DNA-PK (fig.7). Esta fosforilación recluta a Mdc1, lo que amplifica la fosforilación en H2AX al prevenir su defosforilación. Mdc1 y  $\gamma$ -H2AX facilitan el reclutamiento de otros muchos factores adicionales al sitio del daño, generándose focos de 53BP1, un mediador con funciones en recombinación que también recluta a Chk2 y a p53. Mdc1 es a su vez poliubiquitilada, lo que permite que se complete la formación de focos IRIF (IR-induced foci). La fosforilación de Mdc1 recluta a la ubiquitin-ligasa E3, Ubc13-Rnf8, que ubiquitina  $\gamma$ -H2AX y posiblemente otras proteínas para reclutar 53BP1 y Brca1.

### 3.1.3 Efectores

Los efectores, ejecutan las funciones de la DDR. Se han identificado más de 700 proteínas fosforiladas por ATM y ATR en respuesta a daño al ADN (Matsuoka *et al.*, 2007). Entre ellas se encuentran sobre todo proteínas implicadas en replicación del ADN, como MCMs, ORC, ADN polimerasa etc, proteínas con funciones en reparación del ADN como BRCA1, BRCA2, XPA etc y del metabolismo de nucleótidos, entre otras.

## 3.2 Checkpoints, ciclo celular y Cdks

El papel principal que se ha asignado tradicionalmente a las Cdks en la DDR es el de dianas moleculares de los puntos de control o Checkpoints de G1/S y G2/M para parar el ciclo celular (figs. 6 y 7):

**Checkpoint de G1/S:** Si un daño es detectado durante G1, se iniciará la cascada de señalización descrita anteriormente (fig. 7) que resulta en la activación de ATM/ATR. ATM y Chk2 fosforilarán a p53 en sus serinas 15 y 20 y a Mdm2 en su serina 395. Esto resulta en la estabilización y activación de p53 que a través de su efector p21<sup>cip1</sup> bloqueará el complejo Cdk-Ciclina A/E necesario para la progresión por la fase S. Por otro lado, Chk2 y Chk1 también inactivarán fosforilando a la fosfatasa cdc25A en su Ser123 (Donzelli y Draetta, 2003), lo que resulta en la pérdida de actividad de estos complejos Cdk al retener Cdk2 sus fosforilaciones inhibitorias en la treonina 14 y la tirosina 15. Como consecuencia de ambos efectos se produce una parada del ciclo celular en la transición entre G1 y S. Recientemente el grupo Stephen Elledge ha encontrado mediante cribado con técnicas de proteómica que tanto Ciclina E como dos de sus reguladores: FBW7 y p27<sup>kip1</sup> se fosforilan en respuesta a daño, lo que podría constituir un mecanismo adicional de acción del checkpoint (Matsuoka *et al.*, 2007).

**Checkpoint de G2/M:** De igual manera, si la célula detecta daño en G2, se iniciará la cascada de señalización descrita anteriormente (fig.7) que resulta en la activación de ATM/ATR. Estas

proteínas activarían mediante fosforilación a Chk1 (ser345) y Chk2 (thr87) que inactivaría Cdc25 por fosforilación en su ser216. Como consecuencia, se produciría la inactivación de Cdk1 al retener esta sus fosforilaciones inhibitorias en treonina 14 y tirosina 15, produciéndose un bloqueo en la transición G2/M.

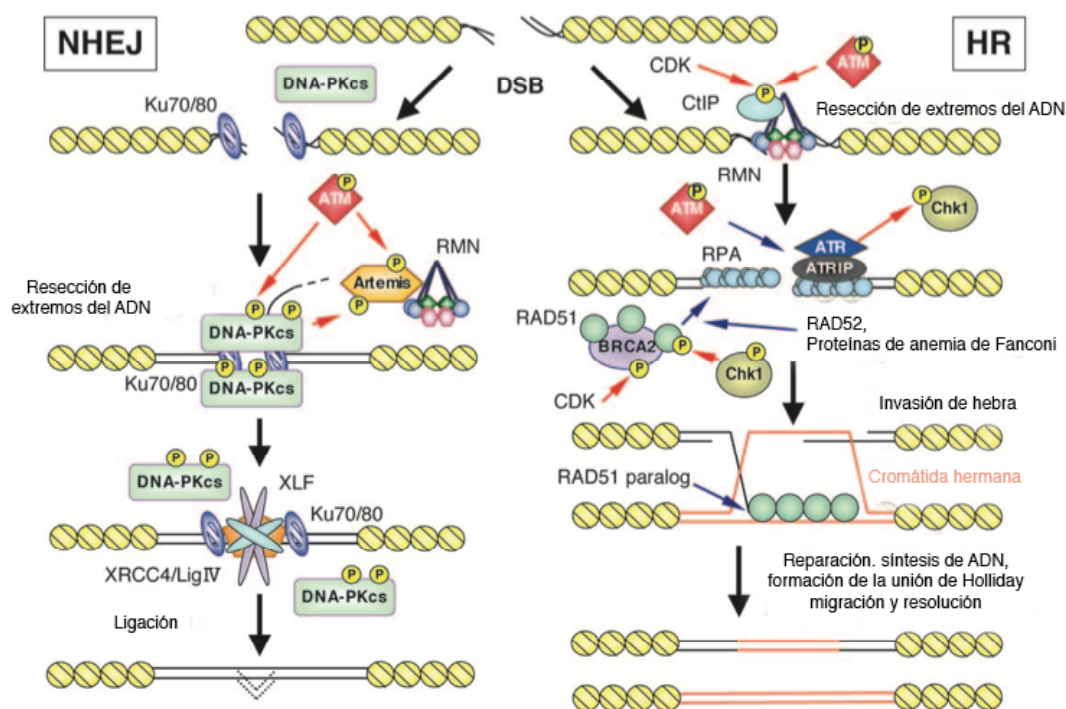
Recientemente se han asignado a las Cdks funciones no sólo como dianas de los checkpoints sino como reguladoras de estos (Ira *et al.*, 2000; Nylon *et al.*, 2004; Jazayeri *et al.*, 2006; Clerici *et al.*, 2008). Se ha visto por ejemplo que Cdk2 activa ATRIP fosforilándolo en ser224 (Myers *et al.*, 2007). Adicionalmente a la regulación del Checkpoint, se ha visto que las Cdks regulan también a las proteínas de reparación BRCA1 y BRCA2 (Deans *et al.*, 2006; Esashi *et al.*, 2005) así como el proceso esencial de resección del ADN que decide el sistema de reparación que usará la célula (Müller-Tidow *et al.*, 2004; Sartori *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2008; Yata y Esashi 2008).

### 3.3 Reparación del ADN

En eucariotas, las roturas de doble cadena se reparan principalmente a través de las vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ por Non homologous end joining) y recombinación homóloga (HR por Homologous recombination). Si bien NHEJ es un sistema eficiente de reparación, a menudo causa pérdida de información genética debido al procesamiento de los extremos por nucleasas que se produce cuando los extremos no encajan perfectamente (Kobayashi *et al.* 2008). HR es un sistema más seguro de reparación, pero a diferencia de NHEJ, HR ocurre tan sólo en S tardío y G2, puesto que depende de la existencia de cromátidas hermanas que provean de moldes para reparar (Delacote *et al.* 2008; Yata y Esashi 2008).

#### 3.3.1 Reparación por NHEJ

La reparación por NHEJ ocurre a lo largo de todo el ciclo. Ku70/80 y la DNA-PKcs se unen al DSB para mantener unidos ambos extremos del ADN (Lieber *et al.* 2008) (fig.8). La DNA-PKcs se activa al interactuar con Ku70/80 y el DSB. Esto facilita el reclutamiento del resto de los factores de reparación como Artemis (nucleasa que procesa los extremos cohesivos que se pueden generar en la rotura (Ma *et al.*, 2005)), el complejo Ligasa IV XRCC4/DNA y XLF (Van Gent *et al.* 2007). ATM regula esta ruta de reparación a través de la fosforilación de Artemis y de la fosforilación de DNA-PKcs en la treonina 2609 (Lieber *et al.* 2008).



**Figura 8. Mecanismos de reparación del ADN. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y reparación por recombinación homóloga (HR).** La elección entre ambas rutas es crítica para la supervivencia celular. Este proceso es dependiente de ciclo celular y se encuentra regulado por actividad Cdk. (Adaptado de Iijima *et al.*, 2008)

### 3.3.2 Reparación por HR

Las rutas de HR implican a numerosos factores y procede mediante varios pasos (fig.8). El primer paso en la HR es la resección del DSB para generar extremos cohesivos 3'. Esta modificación del DSB se puede producir enzimáticamente por el complejo RMN, Exo1 o por nucleasas aun desconocidas (Li y Heder 2008). En el siguiente paso, RPA se une al 3' cohesivo para proteger el ADN y prevenir la formación de estructuras secundarias en el ADN de cadena sencilla. A continuación RPA es sustituida por RAD51, que interviene en la invasión de hebra y la síntesis de ADN que usa la cromátida hermana como molde. Este paso requiere de proteínas parálogas a RAD51 (RAD51C, RAD51D, etc), BRCA2 y proteínas de la anemia de Fanconi. Finalmente, la estructura creada con uniones de Holliday se procesa y es resuelta por helicasas (BLM, WRN, etc) y nucleasas (Mus81/Eme1, etc) de (Iijima *et al.*, 2008). Puesto que la reparación por HR se realiza mediante resíntesis de ADN, usando como molde ADN homólogo sin dañar, permite reparar el ADN con mucha fidelidad.

### 3.3.3 Cdks y elección del sistema de reparación

Como hemos dicho anteriormente, las roturas de doble cadena (DSBs) se reparan principalmente mediante dos mecanismos: reparación no homóloga (NHEJ) y por recombinación homóloga (HR). NHEJ supone un modo rápido de fusionar los extremos de DSB a lo largo del ciclo

celular, evitando eficientemente la fragmentación del cromosoma, lo que tendría consecuencias desastrosas para la célula. Sin embargo, puede conllevar pequeñas pérdidas de material cromosómico. Por otro lado, si bien la reparación mediante HR durante las fases S y G2 del ciclo es un sistema preciso, su desregulación y activación en otras fases del ciclo, podría resultar en amplificación de secuencias genómicas repetidas y pérdida de heterocigosidad (Richardson *et al* 2004; Bishop *et al* 2002; Van Gent *et al* 2001). Por tanto, para la célula es esencial utilizar la vía de reparación que proporcione el menor riesgo de destrucción de información genética dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se presenta y del número de DSB. (Zierhut *et al* 2008; Shrivastav *et al* 2008; Delacote *et al* 2008).

En los últimos años se han generado numerosas evidencias genéticas y bioquímicas que implican a las Cdks en la regulación de las vías de reparación, así como en la elección de HR como sistema de reparación durante S y G2. Por ejemplo, se ha demostrado que inhibidores químicos de Cdks sensibilizan a las células frente a DSB (Maggiorella *et al* 2003; Deans *et al* 2006; Ongkeko *et al* 1995). Otros experimentos publicados más recientemente y realizados tanto en levaduras como en células de mamíferos muestran que la actividad Cdk es esencial para la resección del ADN y la progresión de HR a lo largo de S y G2 (Caspari *et al* 2002; Ira *et al* 2004; Deans *et al* 2006; Ferreira *et al* 2004; Sonoda *et al* 2006; Sartori *et al.*, 2007).

El paso clave para que se produzca la recombinación homóloga es la resección del DSB para generar ADN de cadena sencilla que permita buscar secuencias con homología. Sartori y colaboradores (Sartori *et al.*, 2007) reportan que CtIP (por CtBP interacting protein) es imprescindible para la resección del DSB, la reparación por recombinación homóloga y la activación de ATR en respuesta a la generación de DSBs (fig.8). CtIP interacciona con el complejo del MRN potenciando la actividad nucleasa de MRE11, lo que indica que MRN actúa como iniciador de la recombinación homóloga, promoviendo la resección del DSB a través de su interacción con CtIP, Este grupo ha demostrado que es imprescindible la fosforilación de CtIP por actividad Cdk para que se active la ruta.

Más recientemente, el mismo grupo (Huertas *et al.*, 2008) ha demostrado que el gen homólogo funcionalmente a CtIP en *Saccharomyces cerevisiae* es *sae2*, y que su fosforilación en el residuo Ser267 por actividad Cdk, es esencial para que proceda la resección del ADN y la posterior reparación por recombinación homóloga. Este residuo ser267 de *sae2* es el ortólogo al thr847 de CtIP, si bien Sartori y colaboradores. no muestran que sea ese el residuo responsable de la activación de CtIP.





# Objetivos



Los objetivos de la presente tesis son:

1. Determinar si las Cdks de interfase son esenciales para el desarrollo del ciclo celular.
2. En caso de que las Cdks de interfase no sean esenciales, caracterizar el funcionamiento del ciclo celular en su ausencia y determinar los mecanismos moleculares que compensan su ausencia.
3. Determinar la relevancia del papel de las Cdks en la respuesta frente a daño al ADN.
4. Determinar la identidad de la Cdk responsable del inicio de la reparación por recombinación homóloga.
5. Determinar el papel que juega la actividad Cdk total en la eficiencia de la iniciación de la reparación por recombinación homóloga y el funcionamiento del checkpoint de G2/M.



# **Materiales y métodos**



## 1. Mantenimiento y genotipaje de los ratones

Para realizar las extracciones de MEFs y demás estudios se mantuvieron y cruzaron los ratones de genotipo Cdk2(+/-) Cdk4(+/-) Cdk6(-/-) generados por los Doctores. David Santamaría y Cédric Barrière en un fondo mixto 129/SvJ x C57BL/6J. El genotipaje de los ratones se hizo de forma rutinaria por extracción de ADN de las colas de los ratones y tecnología de PCR basada en el diseño de oligonucleótidos que nos permitan en cada caso un diagnóstico diferencial del genotipo de los ratones. Para el genotipaje del locus correspondiente a Cdk2 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

3B9: 5'-GAAGACCCTCCAGGTGAATGAA-3'

3B8: 5'-CAAGTTGACGGGACAAGTTGTG-3'

IN3R3: 5'-GCGATAAGCTTCGAGGGACC-3'

La combinación 3B8/3B9 amplificaba una banda de correspondiente al alelo silvestre mientras que la combinación 3B8/IN3R3 hacia lo propio con la forma mutante de Cdk2 los ensayos se realizaron en dos reacciones de PCR diferentes. Para genotipar el locus correspondiente a Cdk4 se usaron los siguientes oligonucleótidos:

pDC1: 5'-TCTTTGTGCCTAGTGCGATG-3'.

pDCWc: 5'-ATGATCACCAGCTAGTCGTC-3'.

pDCKO: 5'-TACCAGAGCGTAACCCACCTG-3'.

La combinación de los oligos pDC1/pDCWc genera una banda de 600pb correspondiente al alelo silvestre. La combinación de los oligos pDC1/pDCKO genera, a su vez, una banda de 450pb que se corresponden con el alelo deletado.

Para genotipar el locus correspondiente a Cdk6 se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Cdk6r\_4B1: 5'-ATTGGCAAACACATTCTTACACATT-3'.

Cdk6f\_4B3: 5'-CGCGAGTGCGACTCCCC-3'.

PGKr\_2B2: 5'-GCCTACCCGCTTCCATTGCT-3'.

La combinación de los oligos Cdk6r\_4B1/ Cdk6f\_4B3 genera una banda de 700pb que se corresponde con el alelo silvestre mientras que la combinación de los oligos Cdk6f\_4B3/ PGKr genera una banda de unas 530pb y que se corresponde con el alelo KO.

Todos los animales usados durante el desarrollo de esta tesis se mantuvieron en consecuencia con la ley de protección animal española (RD1201/2005) y la directiva europea (86/609/CEE) establecidos para regular los estándares de mantenimiento animal.

### 1. Preparación de fibroblastos embrionarios de ratón

Los experimentos *in vitro* con células se han hecho principalmente con MEFs (*Mouse embryonic fibroblast*), obtenidos a partir de embriones E13,5. Debido a la letalidad embrionaria asociada a la triple carencia en Cdk2, Cdk4 y Cdk6, se extrajeron los embriones de este genotipo y sus controles a día E12,5. Para ello, se siguió el siguiente protocolo. Los embriones fueron extraídos del útero materno y separados del saco vitelino, eliminándose el hígado y la cabeza, ésta última se usó como fuente de ADN para el genotipaje del embrión. El resto fue sometido a una primera disgregación mecánica con la ayuda de un bisturí y a continuación a una disgregación enzimática por tratamiento de cada embrión con 3 ml de solución de tripsina-EDTA (GibcoBRL) durante 10 minutos a 37°C. La suspensión de células procedente de cada embrión se sembró en una placa de 150 mm de diámetro y cuando el cultivo se aproximó a confluencia (3 días después, generalmente) las células se recogieron y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Se consideró pase 1 de estas células el momento en que fueron puestas en cultivo después de la descongelación.

### 2. Condiciones de cultivo

Los cultivos de MEFs se mantuvieron en DMEM con 4500 mg/l de glucosa (GibcoBRL) suplementado con antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 10% de suero bovino fetal (*foetal bovine serum*, FBS). En un principio, los MEFs se mantenían en condiciones Standard de cultivo (37°C, 5%CO<sub>2</sub> 21%O<sub>2</sub>). Más tarde, para buscar unas condiciones más fisiológicas, se utilizaron incubadores de bajo nivel de Oxígeno (3%) y placas recubiertas de la proteína fibronectina que facilita la adhesión celular así y crea un entorno más fisiológico para el fibroblasto.

### 3. Ensayos de proliferación celular

**Ensayos de inmortalización:** los ensayos de inmortalización se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Todaro y Green en 1963 basado en el cultivo seriado de los MEFs. Así, a pase 2 se sembraron 10<sup>6</sup> células por placa de 10 cm manteniéndose en cultivo durante 3-4 días. Transcurrido este periodo de tiempo (designado como pase) se contó el número de células resultante de las divisiones acumuladas durante esos días, volviéndose a plaquear nuevamente 10<sup>6</sup> células. Este proceso se repitió tantas veces cuantas fue necesario para que las células superasen la fase de crisis y adquirieran nuevamente la capacidad de proliferación exponencial propia de cultivos primarios durante los pases iniciales de crecimiento. Cuando se comprobó que dicha proliferación exponencial persistía en el tiempo durante 2 o 3 pases, consideramos que la inmortalización celular se había producido y estabilizado con éxito,



procediéndose finalmente a la congelación del cultivo. En las gráficas que se muestran en el apartado de resultados aparece representado en escala logarítmica el número acumulado de células, que se calculó como el producto entre, la tasa de crecimiento (cociente obtenido de dividir el número de células contadas en un determinado pase entre el número de células sembradas en el pase anterior) y el número inicialmente plaqueado de células en el caso del primero de los pases o el número acumulado precedente, en el caso de los pases subsiguientes.

**Curvas de crecimiento:** Se realizaron sembrando  $5 \times 10^4$  células (primarias o inmortales, dependiendo de los casos) por pocillo en placas de 6 pocillos y por duplicado (para cada punto y clon), llevándose a cabo contajes diarios durante 4-6 días. A lo largo de ese tiempo y durante una o dos veces, se procedió al cambio de medio a fin de mantener las condiciones de proliferación óptimas. Como método adicional para cuantificar la proliferación se empleó el ensayo MTT (Roche) Se sembraron en placas de 96 pocillos 1000 células por triplicado, se incubaron las células con 10 ml del reactivo MTT1 durante 4 horas, después se añadió 100 ml del reactivo MTT2 y se dejó la placa 24h a 37°C hasta que se procedió a su lectura a 595nm.

**Entrada en fase S:** Para analizar la cinética de entrada en fase S, se sembraron en placas de 10 cm  $5 \times 10^5$  MEFs primarios que se mantuvieron en cultivo con suero 0,1% durante 72 horas a fin de favorecer la sincronización celular en G0. Al cabo de los 3 días se forzó la entrada de estas células quiescentes en el ciclo celular, mediante la adición de medio DMEM suplementado con 10% de suero, recogiendo muestras a distintos tiempos post-estimulación que se sometieron posteriormente a distintos tipos de análisis bioquímicos y citométricos. En algunos casos se aplicó un pulso de BrdU (50 mM) 1 hora antes de la recogida de las células y en otros se añadió BrdU al mismo tiempo de estimular las células.

## 5. Inmunotinción de células marcadas con BrdU y análisis mediante citometría de flujo

MEFs marcados o no con el análogo estructural de la timidina, BrdU (usado a una concentración de 50 mM y con un tiempo de exposición variable según el experimento) fueron recogidos y fijados con etanol al 70%. Para analizar la distribución de las distintas poblaciones celulares a lo largo de las fases del ciclo, se realizó una tinción con yoduro de propidio (50 mg/ml) en presencia de 0,5 mg/ml de ARNasa, previo lavado con PBS. Para detectar células en proliferación activa se cuantifica la incorporación de BrdU junto con la información que proporciona el agente intercalante (yoduro de propidio). Así, las células son permeabilizadas durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de pepsina (0,2 mg/ml) y HCl (0,2N). Después el HCl es neutralizado con 0,1M de tetraborato sódico pH 8,5 y a continuación las muestras son bloqueadas en una solución que contiene suero murino. Finalmente las células se incuban durante 30 min. a 25°C con el anticuerpo primario contra BrdU (Pharmingen) diluido 1:5 en la solución de bloqueo. Como el anticuerpo está conjugado con un fluorocromo no se requiere el uso de ningún secundario. Por último las muestras celulares procesadas como hemos visto,

fueron procesadas por el citómetro de flujo (Facsaria, BD) . La información de BrdU proporcionada por el Facs fue analizada mediante el programa Cell Quest Pro (BD) y las distintas fases del ciclo celular fueron asignadas mediante el programa informático ModFit (Verity software house).

## 6. Transfecciones e infecciones retrovirales y lentivirales

La introducción de ADN exógeno en células 293T o células empaquetadoras Phoenix se realizó mediante transfección con lipofectamina 2000 (Invitrogen), producto de carácter anfipático capaz de formar pequeñas vesículas o micelas alrededor del ADN plasmídico, permitiendo la entrada de éste en el medio intracelular al fusionarse la envuelta micelar con la membrana lipídica. Las células diana se sembraron a altas densidades y en ausencia de antibióticos (para evitar la toxicidad de la lipofectamina) un día antes de realizarse la transfección. Las cantidades de lipofectamina y ADN que se usaron en todos los experimentos mostrados son de 30  $\mu$ l y 14  $\mu$ g respectivamente por reacción de transfección para una placa de 10 cm . Los MEFs son células que se transfectan con muy baja eficiencia, así que para hacerles llegar ADN exógeno se recurrió al uso de retrovirus y lentivirus.

La generación de retrovirus se realizó empleando líneas celulares empaquetadoras donde se lleva a cabo la encapsidación y producción vírica. En nuestro caso utilizamos unas células derivadas de la línea de riñón humana 293T, denominadas phoenix que ya contenían en su genoma los genes de empaquetamiento (env, cap y pol). Estas células son transfectadas, mediante el protocolo descrito anteriormente, con 12  $\mu$ g de ADN plasmídico integrado por cantidades equivalentes del vector retroviral pBabe vacío o portador de cada uno de los genes de interés y un plásmido que contiene los genes ecotrópicos de encapsidación (pCL-ECO) a fin de aumentar la eficiencia del proceso. Al día siguiente, las células se pasan a incubadores de 32 °C para favorecer la estabilidad de los retrovirus en el medio de cultivo, permaneciendo a esta temperatura entre 36 y 48 horas. Un día antes de la transducción, los MEFs receptores de la descarga viral son plaqueados a no muy alta densidad ( $10^6$  células por placa de 10 cm) a fin de permitir una proliferación celular activa necesaria para que la integración del retrovirus ocurra con eficiencia. A las 48 horas post-transfección, el sobrenadante de las phoenix que contiene las partículas víricas, se recoge y filtra por una malla de 45  $\mu$ m para eliminar contaminaciones de células empaquetadoras. Después es añadido a los MEFs en cultivo (5ml de sobrenadante por placa de 10cm) junto con polibreno (8 $\mu$ g/ml, Sigma) que favorece la agregación e infectividad de los retrovirus. Tras una incubación a 32°C de 12-16 horas se cambia el medio de cultivo y se pasan las placas a incubadores de 37°C. Transcurridas 24-36 horas tras la infección, comienza el proceso de selección cuya duración dependerá del antibiótico utilizado. Así, en presencia de puromicina (2  $\mu$ g/ml), 2 días son suficientes. Con higromicina (50  $\mu$ g/ml) el tiempo de selección aumenta hasta casi 5 días. Finalmente las células se recogen para someterlas a distintos ensayos bioquímicos, proliferativos y de citometría.

Para la generación de lentivirus, se realizó el mismo procedimiento, sólo que en lugar de transfectar células empaquetadoras Phoenix, se cotransfectan células 293T con 10mg del vector lentiviral (pLKO) y los tres plásmidos pLP1, pLP2, pLPVSVG que proporcionan los genes de empaquetamiento en trans. Para los experimentos de reducción de Cdk1 por shRNA se emplearon los shRNAs desarrollados por Sigma (LentiviralMission shRNA plasmids SHGLY-NM\_007659, Sigma)

## 7. Análisis de Checkpoints

**Análisis del checkpoint de G1/S:** Este Checkpoint se analizó de dos modos. En el primero, 10 horas tras irradiar con distintas intensidades de rayos gamma (1,4,8Gy) se fijaron las células y se analizó su perfil de ciclo mediante marcaje del contenido de ADN con Ioduro de propidio y cuantificación en el FACs. En el segundo, se acumularon las células en G0 mediante retirada de suero, se irradiaron con 8Gy y se estimuló con suero la entrada en ciclo. Se recogieron células a distintas horas tras estimular y se analizó el porcentaje de células en fase S mediante un pulso de BrdU y su posterior análisis en el FACs cuya metodología se describe más adelante.

**Análisis del Checkpoint de G2/M:** Se analizó de dos maneras. En la primera, 24 horas tras irradiar con 10Gy se analizó la distribución de las distintas fases del ciclo celular mediante Ioduro de propidio y Facs. En la segunda, células creciendo asincrónicamente fueron dañadas con el agente radiomimético Neocarcanoestatina con las dosis 50ng/ml o 250ng/ml y tras 45 minutos se recogieron las células y se fijaron con etanol frío al 70%. Posteriormente se permeabilizaron durante 15 minutos en Triton X-100 sobre hielo y se incubó con 0,75µg/100ml del anticuerpo antiH3 (Upstate 06-570) durante 3 horas a 25°C. A continuación se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 30 minutos a 25°C con el anticuerpo secundario (anti-conejo Alexa 488) diluido 1/200. Finalmente, lavamos las células e incubamos con ARNasa 50µg/ml y yoduro de propidio 50mg/ml durante 30 minutos para poder analizar el perfil de ciclo celular. Finalmente se pasaron las células a tubos de citómetro y se analizaron mediante FACs (Facsaria, BD).

## 8. inmunofluorescencia

Células en cultivo fueron crecidas en placas de cultivo sobre cubreobjetos. Después son fijadas con 4% de paraformaldehído durante 5 minutos lavadas con PBS y guardadas en PBS a 4°C. A continuación las células fueron permeabilizadas durante 5 minutos con 0,4% de tritón X-100 y 0,04% SDS. Tras la permeabilización, las células se bloquearon con 3% BSA en PBS durante 45 minutos a 37°C. Finalmente se realizaron dos incubaciones consecutivas de 45 minutos de duración cada una, primero con un anticuerpo monoclonal que reconocía la proteína centrosómica g-tubulina (SIGMA) y a continuación con el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con un fluoróforo (Molecular probes). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y entre ellas se practicaron de 2 a 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno. Antes del montaje con

mowiol, las muestras se incubaron 2 minutos con DAPI para permitir la visualización de los núcleos. Por último se contaron centrosomas de 200 células correspondientes a cada uno de los genotipos analizados.

Para el análisis de focos de RPA se procedió de igual modo sólo que se preextrajeron las proteínas que no se encontraban unidas al ADN. Para ello. Primero se incubaron las células sobre los cubreobjetos en tampón CSK1 (10mM PIPES pH6,8, 100mM NaCl, 300mM Sacarosa, 3mM MgCl<sub>2</sub> 1mM EGTA 0,5% Triton X-100) durante 4 minutos sobre hielo para extraer las proteínas. Tras tres lavados con PBS se procedió a la fijación durante 30 minutos con tampón mSTF (150mM 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol, 108mM diosolidinyl urea, 10mM Citrato sódico, 50 mM EDTA pH5,7). Dos lavados con PBS y las células se incuban durante 15 minutos en tampón PB (100mM Tris-HCl pH7,4, 50mM EDTA pH8,0 0,5% Triton X-100) lavar con PBS y bloquear con BSA 5% suero de cabra 10% en PBS durante 30 minutos a 25°C. Incubar O/N a 4°C con una dilución 1/200 de anticuerpo contra RPA32 (Cell Signalling 2208) en PBS 5% BSA 10% suero de cabra. Tres lavados con PBS y añadir anticuerpo anti rata 1/500 marcado con fluoróforo Alexa488 (Molecular Probes) incubando a 25°C durante 45 minutos. En caso de querer marcar también con el marcador de G2, Aurora B, tras esta incubación hay que hacer lavados con PBS para luego incubar con anticuerpo anti Aurora B 1/500 (BD, 611083) en PBS 5% BSA 10% suero de cabra durante 60 minutos a 25°C. Tras ello se procede a efectuar 3 lavados con PBS e incubar durante 30 minutos a 25°C con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con el fluoróforo Alexa594 (Molecular Probes). Efectuar 1 lavado con PBS, incubar con Hoechst 33342 (Invitrogen) 1/5000 en PBS durante 5 minutos y efectuar dos lavados adicionales con PBS. Finalmente, los cubreobjetos se montan sobre un portaobjetos con ayuda del adhesivo Mowiol. Para el visionado de las inmunofluorescencias se empleó el microscopio confocal SP5 (Leica).

#### **10. Microscopía de gran productividad.**

Se cubrieron con fibronectina placas multipocillos de fondo plano de cristal (Greiner). Posteriormente se sembraron en torno a 10.000 células y se procedió a irradiar el día siguiente. 45 minutos tras irradiar, se fijaron las células incubando 5 minutos con Paraformaldehído 4% y se procesaron las muestras como las inmunofluorescencias descritas en el anterior apartado empleando los anticuerpos contra o bien g-H2AX (Upstate 05-636) o bien RPA32 (Cell Signalling 2208). En el caso de RPA32, las células se preextrajeron como está descrito en el anterior apartado. Para la lectura se utilizó el aparato DB pathway Bioimager capaz de fotografiar las células de la placa multipocillo y cuantificar la señal procedente del anticuerpo secundario.

### 11. Ensayo de hipersensibilidad frente al daño al ADN

Se sembraron placas de 96 pocillos sembrando 5000 células por pocillo y por triplicado. Se incubaron con los siguientes agentes que causan daño al ADN: Metilmetanosulfonato (MMS) 0,001%;0,003%;0,006%. Neocarcinoestatina (NCS):50ng/ml;250ng/ml1mg/ml. Afidicolina (Aph):0,2mM;0,5mM;1mM. Se crecieron durante 4 días cuantificando el número de células inicial y final mediante el ensayo MTT descrito en anteriores apartados. Finalmente se calculó la variación porcentual del número de células finales con cada tratamiento con respecto a un control sin tratar.

### 12. Extracción de ADN y proteínas

La extracción de ADN de las distintas muestras empleadas en este estudio se realizó mediante digestión del tejido o de las células con proteinasa K a una concentración final de 400 mg/mL durante 12 horas a 55°C. Tras el tratamiento de las muestras con una solución saturada de cloruro sódico, el ADN se precipitó con isopropanol y se resuspendió en el tampón TE.

Las proteínas se extrajeron lisando las células en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) que contiene NaCl 150 mM, NP-40 0,5% e inhibidores de proteasas (PMSF 100mM más una mezcla encapsulada de otros inhibidores) y de fosfatasa (orto-vanadato sódico 100mM y Fluoruro Sódico 1 mM) durante 20 minutos. En el caso de los extractos obtenidos a partir de los embriones, estos se trocearon con un bisturí y con la ayuda de una aguja de jeringa, se disgregaron mecánicamente en el buffer de lisis para a continuación, ser sonicados de 5 a 10 segundos con una amplitud del 30% e incubados en hielo durante 15 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron 20 minutos a 13000 rpm para eliminar los restos no digeridos y se congelaron a -80°C.

### 13. Western blot

Entre 30-40 mg de proteína, debidamente preparados a partir de los distintos extractos proteicos de interés, fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con TBST 5% leche y finalmente incubados con los siguientes anticuerpos: Cdk1 (17; Santa Cruz), Cdk4 (C22; Santa Cruz), Cdk2 y Cdk6 (anticuerpos desarrollados por Marta Puyol en nuestro laboratorio), Cdk7 (C22; Santa Cruz), Cdk9 (C22; Santa Cruz), Ciclina A2 (H432; Santa Cruz), Ciclina B1 (Santa Cruz), Ciclina D1 (DCS6 yAB4; Neo Markers), Ciclina D2 (593; Santa Cruz), Ciclina E1 (M20; Santa Cruz), p21<sup>Cip1</sup> (C19; Santa Cruz), p27<sup>Kip1</sup> (Transduction Laboratories), p57<sup>Kip2</sup> (Sigma P.0357), b-Actina (AC15, Sigma), pRb (BD Pharmingen). Los anticuerpos fosfoespecíficos contra pRb S608 (#2181), S780 (#9307) y S807/811 (#9308) todos ellos de Cell Signaling, pS1981ATM (Rockland 200-301-400) pS345Chk1 (Cell Signalling 2348) Chk1. (Novocastra DCS-310.1). Finalmente y tras una segunda incubación en presencia de los anticuerpos secundarios apropiados acoplados a peroxidasa (Dako),

la visualización de las proteínas se realizó con ECL (Amersham) usando distintos tiempos de exposición en función del anticuerpo.

#### 14. Inmunoprecipitación y ensayo quinasa

En ambos casos se parte de muestras de 300-500 mg de proteína que se incuban durante toda una noche en presencia de distintos anticuerpos dirigidos contra las proteínas: Cdk1, Ciclina E, Ciclina D1, CiclinaD2. Al día siguiente se realiza una segunda incubación de 3 horas con bolitas de sefarosa unidas a proteína A en las que quedan inmovilizados los complejos antígeno-anticuerpo. A partir de este punto ambos ensayos siguen un procedimiento diferente. En el caso de las inmunoprecipitaciones se realizan 3 lavados con el mismo tampón usado para la extracción de las proteínas, NP40. Después, y tras añadirse el buffer de carga a las bolitas de sefarosa que contienen los inmunocomplejos, las muestras se hierven durante 4 minutos, se centrifugan a 5000 rpm durante un breve espacio de tiempo, 5-6 minutos, y finalmente se someten al protocolo de western blot descrito con anterioridad. Por lo que respecta a los ensayos quinasa, el último de los 3 lavados se realiza con un tampón especial (20mM Tris HCl pH 8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1mM DTT) que es donde se prepara también la mezcla de reacción, consistente en: 1 mM de ATP frío, 10 mCi de g<sup>32</sup> P dATP y 0,5-1 mg del sustrato de fosforilación adecuado: Rb (aminoácidos 769-921, Santa Cruz) o histona H1 (Roche). Dicha mezcla se añade a cada una de las muestras realizándose una incubación de media hora a 30° C transcurrida la cual se detiene la reacción mediante la adición de SDS. Finalmente se hierven los inmunoprecipitados 5 min., se centrifugan para la eliminación de las bolitas de sefarosa y por último se someten a una electroforesis en gel de poliacrilamida. Tras una breve exposición en un casete de PhosphorImager se visualiza la señal radiactiva correspondiente a los sustratos fosforilados por los inmunoprecipitados que se procesa y cuantifica mediante el programa ImageQuant (Bio-Rad).

#### 15. PCR

Las PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de este estudio se realizaron en un volumen de 20 ml, siendo la composición de la mezcla de reacción la siguiente: 250 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 ml de tampón de reacción 10x, 1ml de taq polimerasa, 500 nM de cada oligonucleótido y 1 ml de ADN molde.

#### 16. Micromatrices de ADN

Para analizar la expresión génica. Se crecieron MEFs primarios de pase 1 y se extrajo el ARN mediante el reactivo Trizol (Invitrogen) y purificado usando el kit RNeasy Protect (Qiagen, Hilden). La calidad del RNA se evaluó mediante el sistema BioAnalyzer (Agilent). Se amplificaron y marcaron cinco microgramos de la muestra o de la muestra de referencia con Cy5 y Cy3 mediante el Low RNA input Linear Amplification kit (Agilent). Las hibridaciones se realizaron en micromatrices de expresión Agilent 4x44K expression arrays a 60°C durante 17

horas usando los kits Gene Expression Hybridization y Wash buffer (agilent). Tras los lavados, se escanearon las muestras mediante un escáner Agilent G2565BA. Las imágenes se analizaron con los programas, GenePix 5.1 (Axon Instruments), TM4 y Path Designer Network (Ingenuily Systems). La evaluación de la calidad del ARN así como las hibridaciones fueron realizadas por el servicio de genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.





# Resultados



## 1. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN EN AUSENCIA DE Cdk2 Y Cdk4.

Para poder estudiar la capacidad celular para proliferar sin Cdk2 ni Cdk4 se utilizaron embriones o MEFs procedentes de cruces entre animales Cdk2<sup>+/-</sup>Cdk4<sup>+/-</sup> que fueron generados en el laboratorio por los doctores Cédric Barrière y David Santamaría (Barrière *et al.*, 2007). Los animales Cdk2<sup>-/-</sup>Cdk4<sup>-/-</sup> llegan a P1 y mueren por defectos cardiacos (Barrière *et al.*, 2007).

### 1.1 Caracterización *in vitro* del ciclo celular y la proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4

#### 1.1.1 Proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4

La proliferación es muestra de la eficiencia con la que una célula es capaz de ejecutar todas las fases del ciclo celular, por tanto constituye una magnífica herramienta para evaluar el funcionamiento del ciclo celular. La proliferación de los (MEFs) sin Cdk4 o sin Cdk2 se ve muy levemente disminuida con respecto a las células silvestres. (Berthet *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2003; Rane *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 1999). La eliminación de ambas quinasas genera una disminución adicional en sus tasas de proliferación. (Figura 9A)

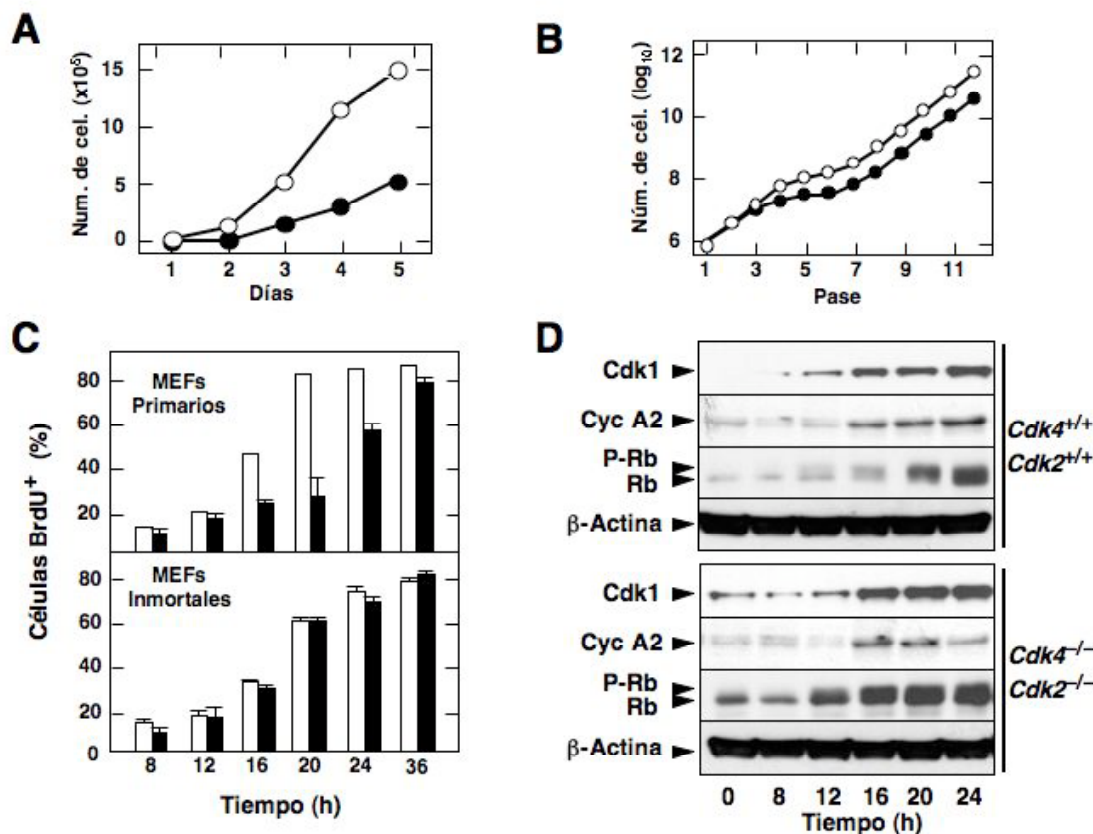
#### 1.1.2 Inmortalización en ausencia de Cdk2 y Cdk4

Siguiendo el protocolo estándar de inmortalización 3T3 nos propusimos analizar la eficiencia de inmortalización de los MEFs Cdk4<sup>-/-</sup>Cdk2<sup>-/-</sup> (fig. 9B). MEFs procedentes de 8 embriones de un total de 10 con el genotipo Cdk2<sup>-/-</sup>Cdk4<sup>-/-</sup> lograron inmortalizarse. Además el 100% de los MEFs (4) se inmortalizaron con éxito en incubadores con bajo nivel de oxígeno (3%). En ambos casos la cinética de inmortalización de los MEFs con deficiencia combinada en Cdk2 y Cdk4 fue similar a los controles silvestres (fig.9B)- Una vez se han inmortalizado, los niveles de proliferación de las células Cdk2<sup>-/-</sup>Cdk4<sup>-/-</sup> se igualan a los de las células silvestres (fig.9B).

#### 1.1.3 Entrada en fase S desde quiescencia en ausencia de Cdk2 y Cdk4

Nos propusimos analizar la eficiencia con la cual se produce la reentrada en ciclo desde quiescencia de nuestros MEFs sin las dos quinasas más importantes para ese proceso, Cdk4 y Cdk2. Como se puede observar en la figura 9C, los MEFs primarios Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> entran en fase S desde quiescencia con retraso aunque finalmente son capaces de llegar a ella en un porcentaje similar al de las células Cdk2<sup>+/+</sup> Cdk4<sup>+/+</sup>. Este retraso desaparece cuando se trata de MEFs inmortales (fig.9C).

El sustrato clave de Cdk2 y Cdk4 en este proceso, pRb, es fosforilado con una cinética similar a la de los MEFs control. Prueba de esto es que los MEFs dobles mutantes presentaron igual capacidad para inducir el programa de E2F que sus controles como lo muestra la expresión de Cdk1 y CiclinaA2 de la figura 9D.



**Figura9. Proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** A. Curva de crecimiento de MEFs de pase 2. (n=3) B. Curva de immortalización (n=3). C. Salida de G0 y entrada en S de MEFs primarios e inmortales. En blanco Cdk2<sup>+/+</sup> Cdk4<sup>+/+</sup>, en negro Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> (n=3). D. Inducción de Cdk1, Ciclina A2 y fosforilación de Rb tras salida de G0.. Barras de error en A. B. y C. = Desviación estándar.

## 1.2 Análisis bioquímico de los embriones Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup>

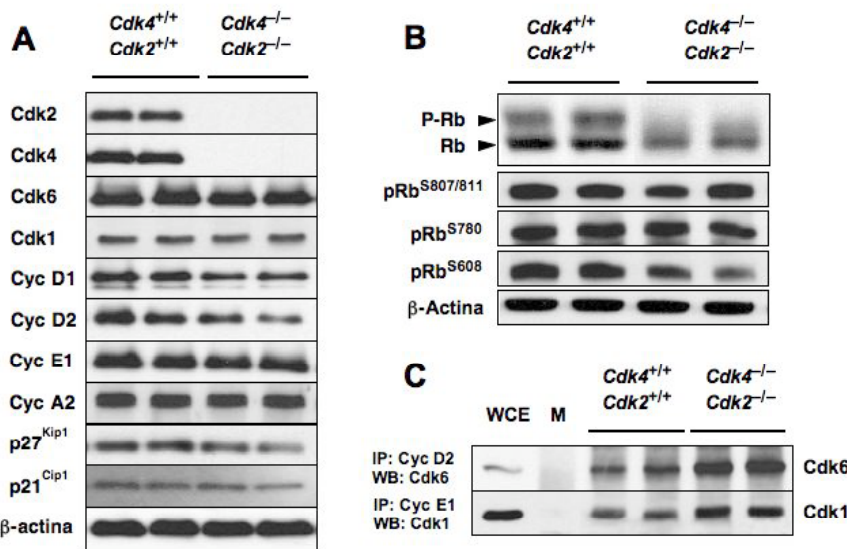
### 1.2.1 Análisis de los niveles de proteínas de ciclo celular

Para comprender los mecanismos moleculares compensatorios responsables de la ausencia de defectos importantes de desarrollo y proliferación en los embriones Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> procedimos a examinar los niveles de los reguladores más importantes del ciclo celular (fig.10A). Para llevar a cabo este análisis, utilizamos embriones tanto de la fase intermedia del desarrollo (13.5) como de fase tardía del desarrollo (E16.5). La eliminación conjunta de Cdk2 y Cdk4 no conlleva alteraciones en los niveles de expresión de las otras Cdks implicadas en el desarrollo del ciclo celular, Cdk6, Cdk1 (fig.10A,11A). Del mismo modo, no se observan alteraciones en los niveles de las Ciclinas de G1/S como Ciclina D1 y D2, Ciclina E1 y Ciclina A2 (fig.10A,11A). Tampoco se vieron alterados los niveles de los inhibidores de Cdks de la familia Cip/Kip como p21<sup>Cip1</sup> o p27<sup>Kip1</sup> (fig.10A,11A). Puesto que Cdk4 y Cdk2 tienen un papel esencial en la fosforilación de Rb, examinamos cómo la ausencia de estas quinasas afectaba a su nivel global de fosforilación y a los residuos conocidos. Como muestra la figura 10B, Rb está hipofosforilado comparado con los embriones control, si bien un análisis más detallado de los residuos funcionalmente caracterizados no demuestra diferencias con respecto a los MEFs control (fig.10B,11B).. Hasta ahora se pensaba

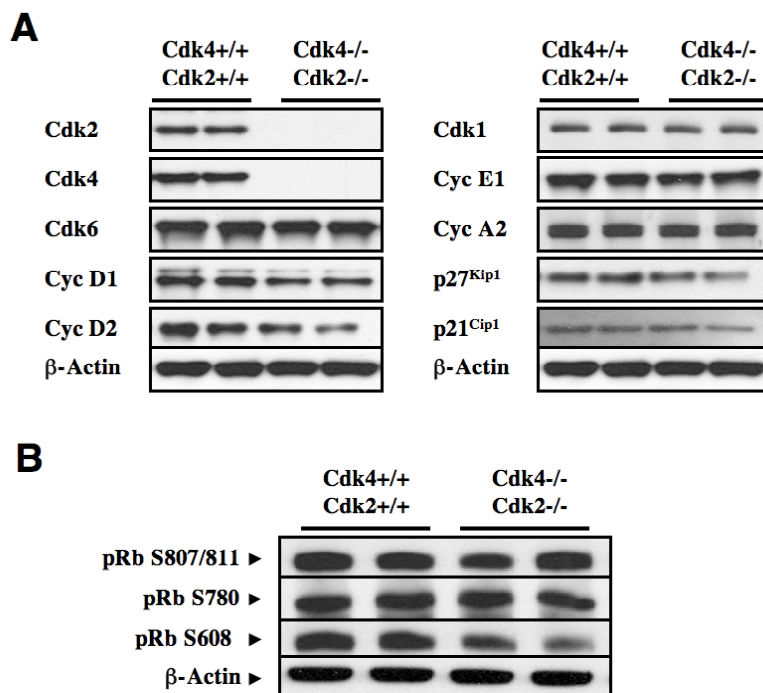
que los residuos S807/811 y S780 eran fosforilados por los complejos Cdk4-CiclinaD y el residuo S608 era diana de fosforilación tanto de Cdk4 como de Cdk2 (Zarkowaska et. al, 1997) . Nuestros resultados sugieren que otros complejos, posiblemente los complejos Cdk6-CiclinaD y Cdk1-CiclinaE, podrían estar fosforilando a Rb en estos residuos funcionalmente caracterizados.

**1.2.2 Complejos Cdk-Ciclina en ausencia de Cdk2 y Cdk4**

Procedimos al análisis mediante Inmunoprecipitación de los complejos que estaban estableciendo las Ciclinas que de forma natural se unen a Cdk4 y a Cdk2, esto es, CiclinaD y CiclinaE respectivamente (fig. 10C). Pudimos observar que en los embriones Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup>, Cdk6 se unía más abundantemente a CiclinaD2 y Cdk1 se unía a CiclinaE. Posiblemente estos complejos son los que compensan la ausencia de Cdk2 y Cdk4.



**Figura10. Análisis bioquímico de los embriones Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> E12.5.** A. Niveles de los principales reguladores del ciclo celular. B. Fosforilación global de Rb y de sitios funcionalmente caracterizados de Rb. C. Niveles de complejos Cdk6-CiclinaD2 y Cdk1-CiclinaE1.



**Figura11. Análisis bioquímico de los embriones Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> E16.5.** A. Niveles de los principales reguladores del ciclo celular. B. Fosforilación de sitios funcionalmente caracterizados de Rb.

## 2 CARACTERIZACIÓN DEL CICLO CELULAR EN AUSENCIA DE LAS TRES QUINASAS DE INTERFASE: Cdk4, Cdk6 y Cdk2.

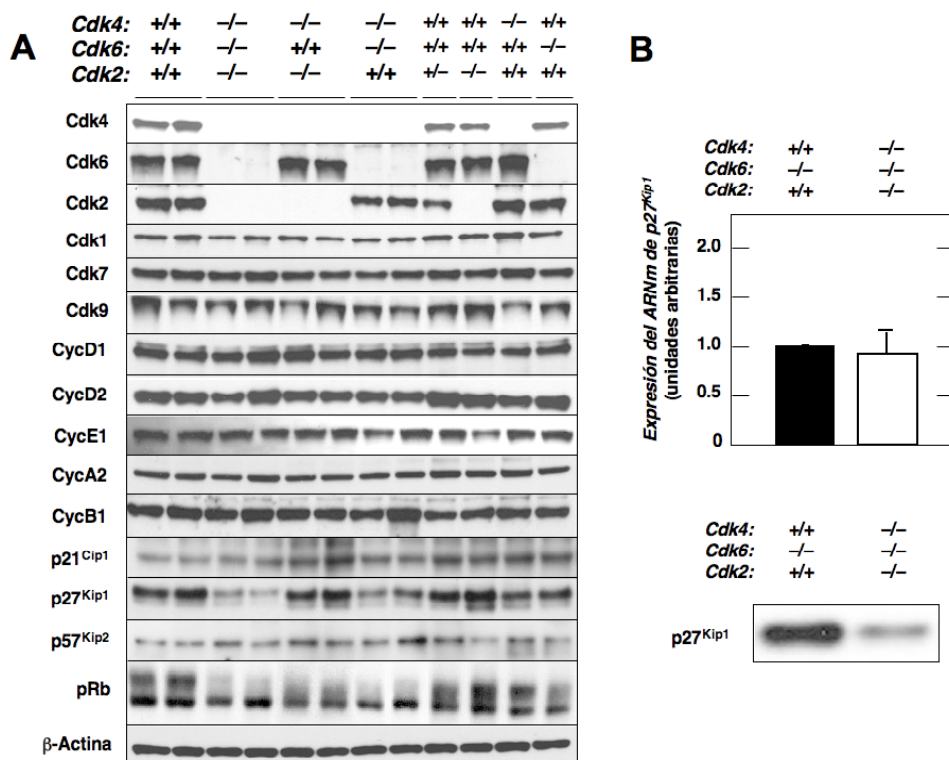
Para poder estudiar la capacidad celular para proliferar sin las tres quinasas de interfase, se utilizaron embriones o MEFs procedentes de cruces entre animales  $Cdk4^{+/-}Cdk6^{-/-}Cdk2^{+/-}$  que fueron generados en el laboratorio por los doctores Cédric Barrière y David Santamaría (Santamaría *et al.*, 2007). Los animales  $Cdk4^{-/-}Cdk6^{-/-}Cdk2^{-/-}$  (TKO) se desarrollan con proporciones mendelianas hasta E12.5 comenzando a morir por severos defectos hematopoyéticos no encontrándose ninguno vivo a E15.5. (Santamaría *et al.*, 2007).

### 2.1 Análisis bioquímico de los embriones $Cdk4^{-/-} Cdk6^{-/-} Cdk2^{-/-}$

#### 2.1.1 Niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular y estado de fosforilación

Para una amplia caracterización del modo en el que afecta la ausencia de las distintas Cdks sobre los niveles del resto de proteínas reguladoras del ciclo celular, se utilizaron embriones de día E12.5 con genotipos silvestres, triples deficientes en Cdk2, Cdk4, Cdk6, con deficiencia combinada de Cdk2, Cdk4; Cdk4, Cdk6 y con deficiencias en Cdk4, Cdk2 o Cdk6 respectivamente. En ningún caso se observó el aumento de otras Cdks como Cdk7 o Cdk9 ni de la Cdk mitótica, Cdk1 (fig.12A). Tampoco se observaron cambios significativos en ninguna de las Ciclinas (D1, D2, E1, A2, B1) (fig.12A). De entre los inhibidores de Cdks de la familia Cip/kip sólo se observó la disminución de  $p27^{kip1}$  en los embriones (fig. 12A). Para conocer si esta disminución del nivel de  $p27^{kip1}$  se debía a una alteración en los niveles de expresión génica o bien a una desregulación a nivel postraduccional, hicimos qRT-PCR, no observando variaciones en los niveles ARNm (fig.12B). Posiblemente la disminución de  $p27^{kip1}$  se deba a una reducción en su estabilidad al desaparecer los complejos Cdk4,6-Ciclina D que se sabe que estabilizan a todo el complejo (Lacy *et al.*, 2004).

pRb se sabe que es uno de los principales sustratos de las quinasas de G1 y S. Por eso analizamos el nivel global de fosforilación de esta proteína comprobando que estaba hipofosforilada en los embriones  $Cdk4^{-/-}Cdk6^{-/-}Cdk2^{-/-}$  (fig.13A). Sin embargo, al igual que sucedía en los embriones  $Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-}$ , los sitios de fosforilación funcionalmente caracterizados como S608, S780 y S807/811 no muestran una gran disminución en los embriones TKO con respecto a los controles silvestres (fig.13A). Esto explicaría que las células de estos embriones sean capaces de ejecutar el programa transcripcional de E2F y con ello proliferar.



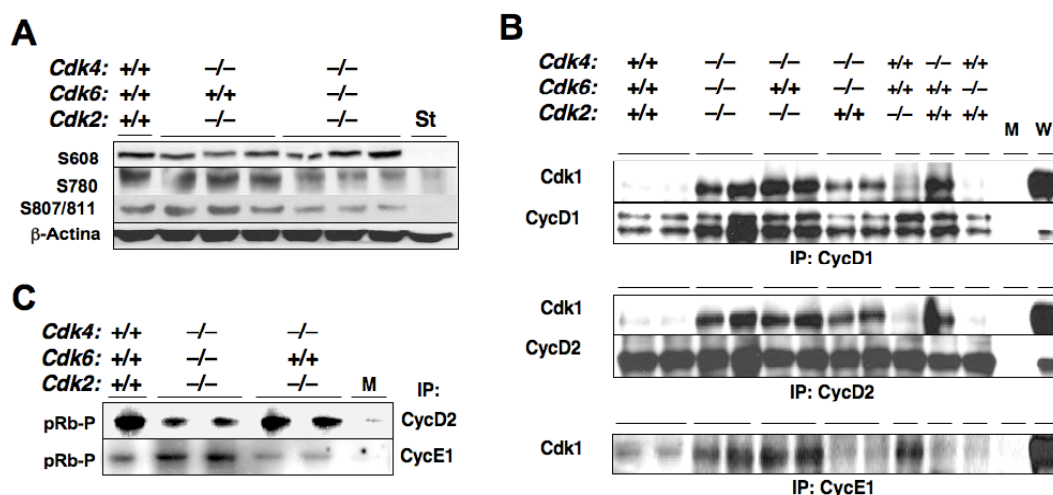
**Figura 12. Niveles de los principales reguladores de ciclo celular en embriones deficientes en Cdk.** A. Sólo p27<sup>Kip1</sup> varía su nivel en los embriones TKO. B. Mediante qRT-PCR no se detectan diferencias en el mRNA de p27<sup>Kip1</sup> de los embriones TKO con respecto a los control mientras que la diferencia sí se detecta en esas células mediante western blot. Barras de error = Desviación estándar.

### 2.1.2 Complejos Cdk-Ciclina en ausencia de las quinasas de interfase.

Para comprender el mecanismo compensatorio que permitía la proliferación celular en los embriones hasta llegar a día E12.5, investigamos si la única Cdk presente, Cdk1, era capaz de unir las Ciclinas de G1 y S. Encontramos (fig.13B) que Cdk1 unía a las Ciclinas D1 y D2 (algo hasta ahora no descrito) además de unir a Ciclina E. También observamos gracias al resto de genotipos usados en el análisis, que Cdk1 era capaz de unir a Ciclina D1 y D2 en cuanto Cdk4 esta ausente. Del mismo modo observamos que Cdk1 se une a Ciclina E1 en cuanto Cdk2 está ausente. Todo ello demuestra que la afinidad de Cdk1 por las Ciclinas D y E no es residual y que en cuanto su principal Cdk desaparece, Cdk1 es capaz de reemplazarla.

### 2.1.3 Actividad quinasa asociada a Ciclinas de G1/S en ausencia de Cdk4, Cdk6 y Cdk2.

Una vez comprobado que Cdk1 se unía a las Ciclinas de G1 y S en ausencia de sus correspondientes Cdk, era necesario ver si además existía una actividad quinasa asociada a estas Ciclinas. Es decir, comprobar si estos complejos eran funcionales. Ensayos quinasa *in vitro* demostraron que tanto Ciclina D2 como Ciclina E1 eran capaces de fosforilar un fragmento de Rb en extractos procedentes de embriones TKO (Figura 13C). Probablemente, los complejos Cdk1-CiclinaD y Cdk1-CiclinaE sean los responsables de esta actividad.



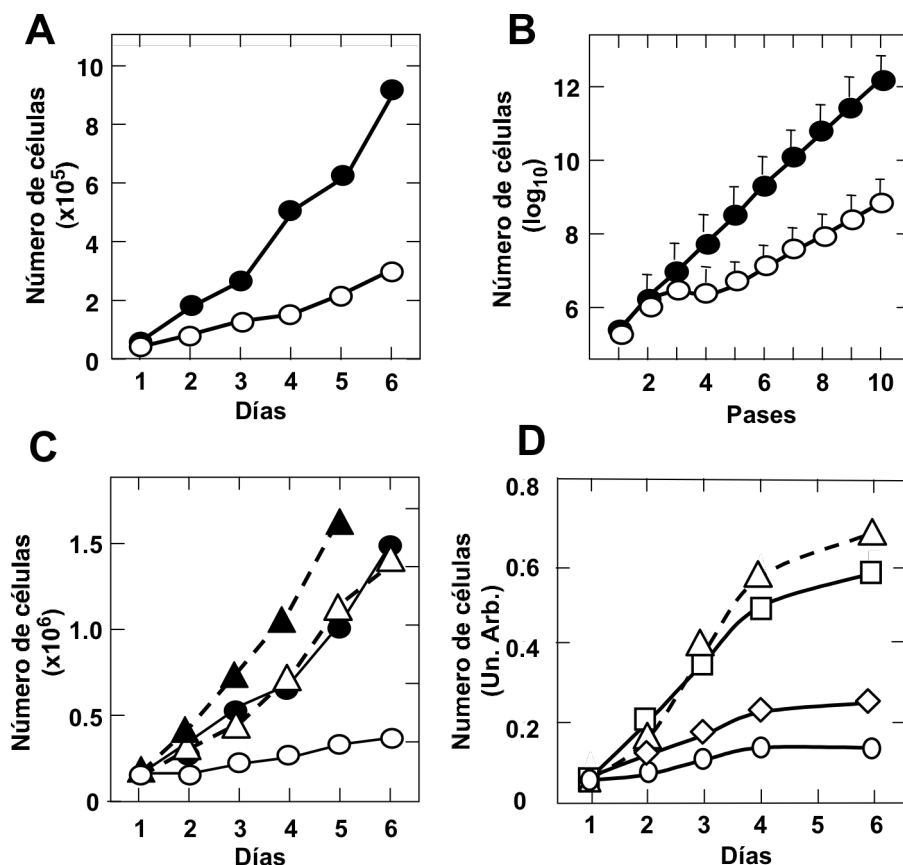
**Figura 13. Complejos de las Ciclinas de G1 y S, funcionalidad de los complejos en ausencia de Cdk de interfase.** A. Estado de fosforilación de sitios funcionalmente caracterizados de Rb. (St.= extracto de células quiescentes) B. Complejos de CiclinaD1, CiclinaD2 y CiclinaE en ausencia combinada de las distintas Cdk de interfase. (M= Inmunoprecipitación con un anticuerpo inespecífico-Mock-, W= extracto celular total) C. Análisis *in vitro* de la actividad quinasa asociada a CiclinaD2 y CiclinaE1 frente a un fragmento de Rb en los genotipos indicados (M= Inmunoprecipitación con un anticuerpo inespecífico-Mock-)

## 2.2 Análisis *in vitro* del ciclo celular en ausencia de Cdk4,Cdk6,Cdk2

### 2.2.1 Proliferación *in vitro* de fibroblastos embrionarios de ratón en ausencia de Cdk2,Cdk4,Cdk6

La proliferación de los MEFs *in vitro* en ausencia de Cdk se ve claramente disminuida (fig. 14A). Sin embargo tras sucesivos pases siguiendo el protocolo estándar 3T3, once de los doce clones usados, lograron immortalizarse (fig.14B). Estos MEFs inmortales a diferencia de los MEFs  $Cdk2^{-/-}Cdk4^{-/-}$ , siguen proliferando en menor medida (fig.14B). Para comprobar si el principal motivo que causaba esta disminución en la proliferación era la ineficiente inactivación de Rb, transducimos los MEFs con un fragmento de 121 aminoácidos del antígeno T grande del virus SV40 (denominado T121). Este oligopeptido es capaz de inactivar a los tres miembros de la familia de Rb sin inactivar a p53 (Sáenz Robles *et al.*, 1994), a diferencia del antígeno T grande completo. La sobreexpresión de T121 aumentó la tasa de proliferación de los MEFs  $Cdk4^{-/-}Cdk6^{-/-}Cdk2^{-/-}$  inmortales y primarios hasta niveles idénticos a los de los controles  $Cdk4^{+/+}Cdk6^{-/-}Cdk2^{+/+}$  (fig.14C). Esto indica que el defecto proliferativo era causado principalmente por una desactivación ineficiente de las proteínas de la familia de Rb (fig 12A y fig.13A). Así mismo, la desactivación mediada por un shRNA de p53 también producía un aumento comparable al producido por la desactivación de Rb si bien un shRNA contra p21 produce un efecto mucho menor (fig.14D). El mecanismo detrás de este efecto es difícil de determinar y será comentado en el apartado de discusión.



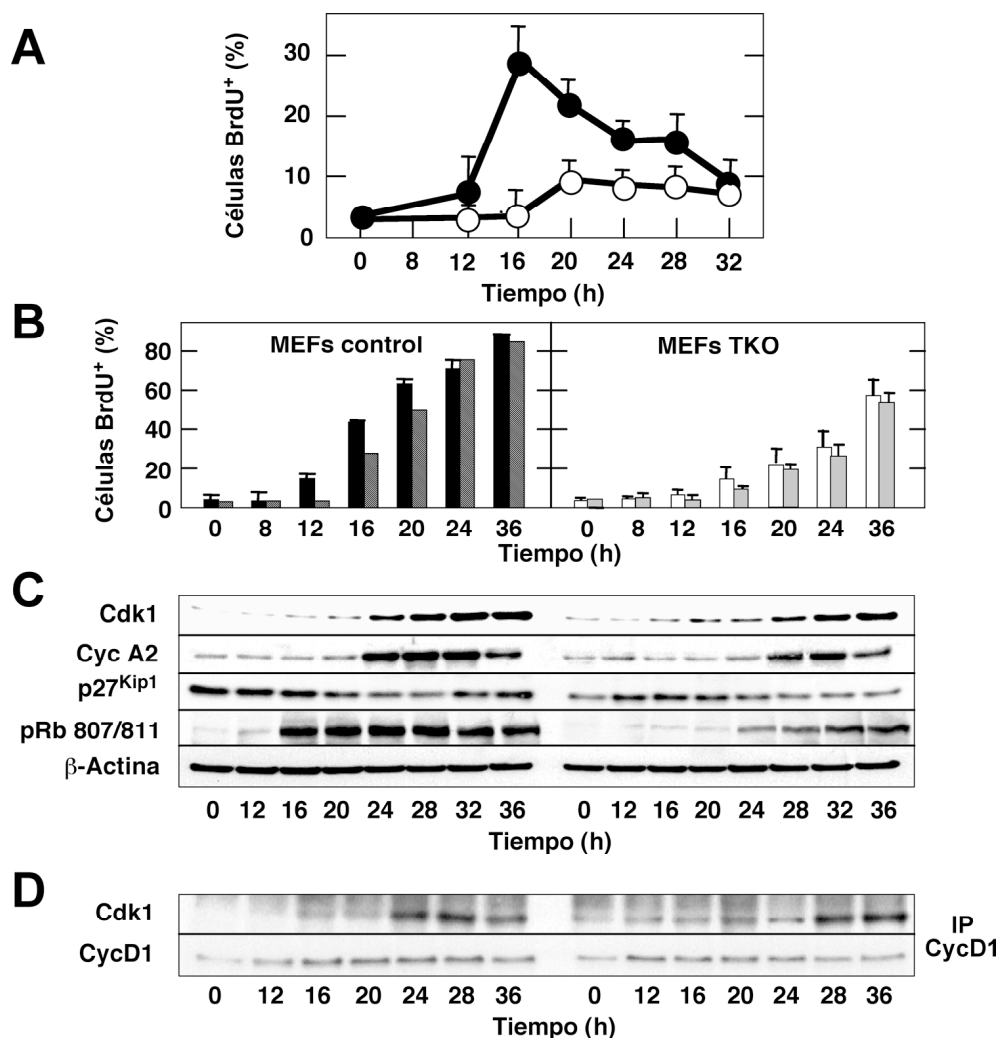


**Figura 14. Proliferación de MEFs TKO.** A. Curva de proliferación B. Curva de immortalización. C. Los niveles de proliferación de los MEFs TKO son rescatados mediante la transducción con T121. D. La transducción con un shRNA de p53 rescata la proliferación a niveles casi idénticos a T121. Apartados A,B,CyD: En círculos blancos MEFs TKO, en círculos negros MEFs Cdk6<sup>-/-</sup>. Triángulos blancos: MEFs TKO transducidos con T121. Triángulos negros: MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> transducidos con T121. Cuadrados: MEFs TKO transducidos con shRNA contra p53. Diamantes: MEFs TKO transducidos con shRNA contra p21. Barras de error en todos los apartados= Desviación estándar.

### 2.2.2 Salida de quiescencia *in vitro* en ausencia de Cdk2, Cdk4, Cdk6.

Se sabe que la entrada en ciclo desde quiescencia y vuelta a la proliferación constituye una dura prueba para la maquinaria del ciclo celular como demuestra que en ausencia de Ciclina E, si bien los ciclos mitóticos continuados son posibles, los MEFs no son capaces de reentrar en ciclo desde quiescencia (Geng Y. *et al.* 2003). Los MEFs Cdk4<sup>-/-</sup> Cdk6<sup>-/-</sup> Cdk2<sup>-/-</sup> tanto primarios como inmortales demostraron ser capaces de tras ser estimulados con suero, entrar en ciclo desde quiescencia aunque con una cinética significativamente retrasada (6-8 horas) y con un mayor grado de asincronía (fig. 15A y 15B). Así mismo, los MEFs sin Cdks de interfase eran capaces de fosforilar Rb y ejecutar el programa de E2F como lo muestra la inducción de Ciclina A2 y Cdk1 (fig.15C). Del mismo modo se produce otro proceso dependiente de actividad Cdk en G1/S, como es la degradación de p27<sup>kip</sup> (fig.15C). Para estudiar la relevancia funcional del complejo Cdk1-CiclinaD, realizamos ensayos de inmunoprecipitación a partir de extractos de MEFs obtenidos a

distintas horas tras su re-estimulación con suero. Observamos que este complejo se forma en las primeras horas (12h) lo que posibilitaría que fuera este complejo el que iniciase la fosforilación de pRB de forma análoga al complejo Cdk4/6-CiclinaD (fig. 15D).



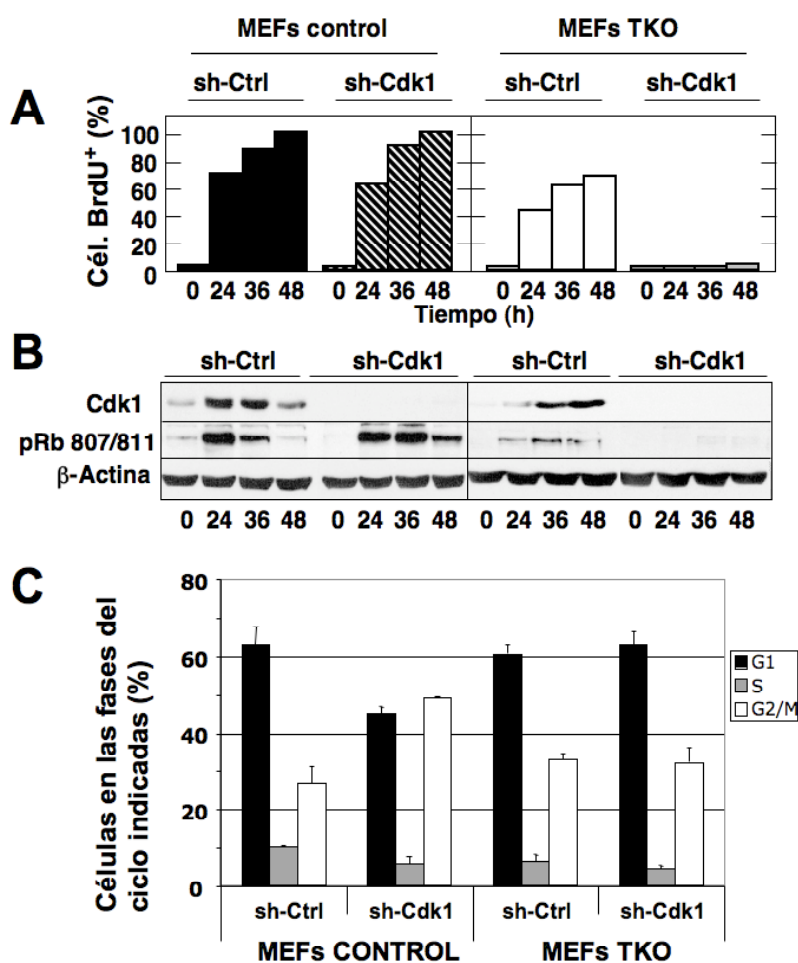
**Figura 15. Análisis de la entrada en fase S desde quiescencia en MEFs TKO.** **A.** Porcentaje de MEFs primarios quiescentes  $Cdk4^{+/+};Cdk6^{-/-};Cdk2^{+/+}$  (círculos negros) y  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-};Cdk2^{-/-}$  (círculos blancos) en fase S tras estimulación con suero y un pulso de 2h de BrdU. **B.** Porcentaje de MEFs primarios quiescentes (en negro) e inmortales (rayas)  $Cdk4^{+/+};Cdk6^{-/-};Cdk2^{+/+}$  MEFs control y primarios (en blanco) e inmortales (gris)  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-};Cdk2^{-/-}$  que han pasado por fase S (creciendo en presencia continua de BrdU desde la estimulación con suero). **C.** Análisis bioquímico de la salida de G0. **D.** Formación de los complejos Cdk1-CiclinaD1 durante la salida de G0. Los datos muestran desviación estándar (n=3)

### 2.2.3 Cdk1 conduce el ciclo celular en ausencia de las Cdks de interfase.

Los MEFs sin Cdks de interfase son capaces de salir de quiescencia y en este contexto, Cdk1 se une a las Ciclinas D y E y hay actividad quinasa asociada a estas. Todo apunta a que Cdk1 es la Cdk que permite a las células atravesar las fases G1 y S del ciclo celular. Para confirmar esta hipótesis, transducimos mediante un lentivirus MEFs TKO con un shRNA contra Cdk1. Al mismo tiempo, retiramos el suero arrojando las células en G0. Tras 72 horas,

reestimulamos con suero y observamos (fig.16A) que en ausencia de Cdk1, los MEFs TKO no eran capaces de salir de G0 e incorporar BrdU, mientras que los controles sí. Así mismo, la fosforilación de Rb en los MEFs TKO tratados con el shRNA de Cdk1 desaparece completamente (fig.16B). Todo ello demuestra que Cdk1 es la encargada de fosforilar a Rb y sustituir a las quinasas de G1 y S en su ausencia

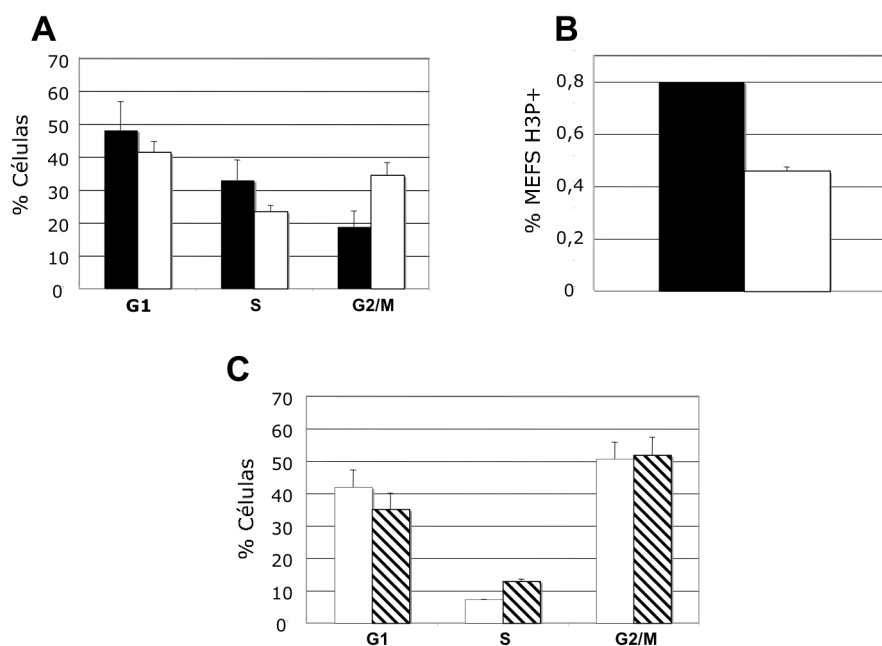
El papel asignado a Cdk1 en células con dotación silvestre de Cdks es el de participar en G2 y sobre todo en la mitosis. El uso de un shRNA contra Cdk1 en células creciendo asincrónicamente nos permitiría comparar si en los MEFs TKO la función de Cdk1 sigue siendo más relevante en G2/M o si por contra es requerida para el desarrollo de todo el ciclo celular. Para comprobar esto, transducimos células creciendo asincrónicamente con un shRNA contra Cdk1, seleccionamos con puromicina y 48 horas después analizamos el perfil de ciclo. En la figura 16C se puede observar que si bien el shRNA de Cdk1 causa acumulación de las células control en G2/M como está descrito, en los MEFS TKO congela el perfil, lo que nos indica que probablemente Cdk1 es la Cdk responsable de conducir todas las fases del ciclo en ausencia de las Cdks de interfase..



**Figura16. Cdk1 conduce el ciclo celular en ausencia de las Cdks de interfase.** **A.** Salida de G0 con el mismo protocolo que la figura 6B, pero transduciendo las células con shRNA control (sh-Ctrl) o un shRNA contra Cdk1 (sh-Cdk1). **B.** Análisis bioquímico de la salida de G0 de la figura A. **C.** Se transdujo con un shRNA control o un shRNA contra Cdk1 células control (Cdk6<sup>-/-</sup>) o células TKO y se analizó el perfil de ciclo celular de los MEFs (n=3). Barras de error= Desviación estándar.

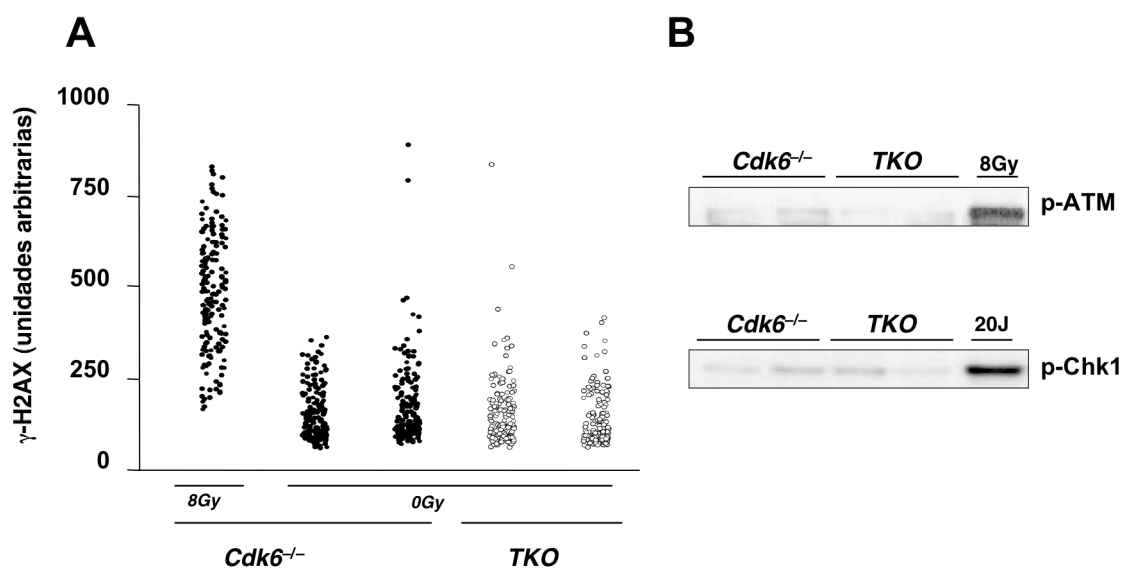
### 2.2.4 Análisis del ciclo celular en ausencia de Cdk4, Cdk6 y Cdk2.

La ausencia de las tres Cdk's de interfase y el hecho de que la desactivación de pRB mediante el T121 rescata la proliferación, nos haría pensar que estas células sufren mayor dificultad para atravesar la fase G1/S del ciclo. Sin embargo, un análisis mediante FACs de la distribución de las fases del ciclo en estas células, muestra una acumulación en G2/M (fig. 17A). Para distinguir entre G2 y M analizamos la presencia del marcador de mitosis, pSer10-histona H3 mediante FACs (Wei *et al.*, 1999) (fig. 17B) determinando que las células presentaban menos mitosis, por lo que el cúmulo se producía en G2. Se sabe que una deficiente desactivación de Rb durante G1 y S tiene como consecuencia un descenso en la transcripción de las proteínas necesarias para la progresión por la fase G2. Nosotros mismos comprobamos que Chk1 se expresa en menor cantidad en los TKOs y se recupera al desactivar Rb con T121 (fig.24). Para comprobar si este era la causa, analizamos la distribución del ciclo en MEFs infectados con T121 (fig.17C). Como se puede ver, la desactivación de RB mediante T121 si bien rescata la proliferación, como se puede ver por el aumento de células en S, no rescata la acumulación en G2.



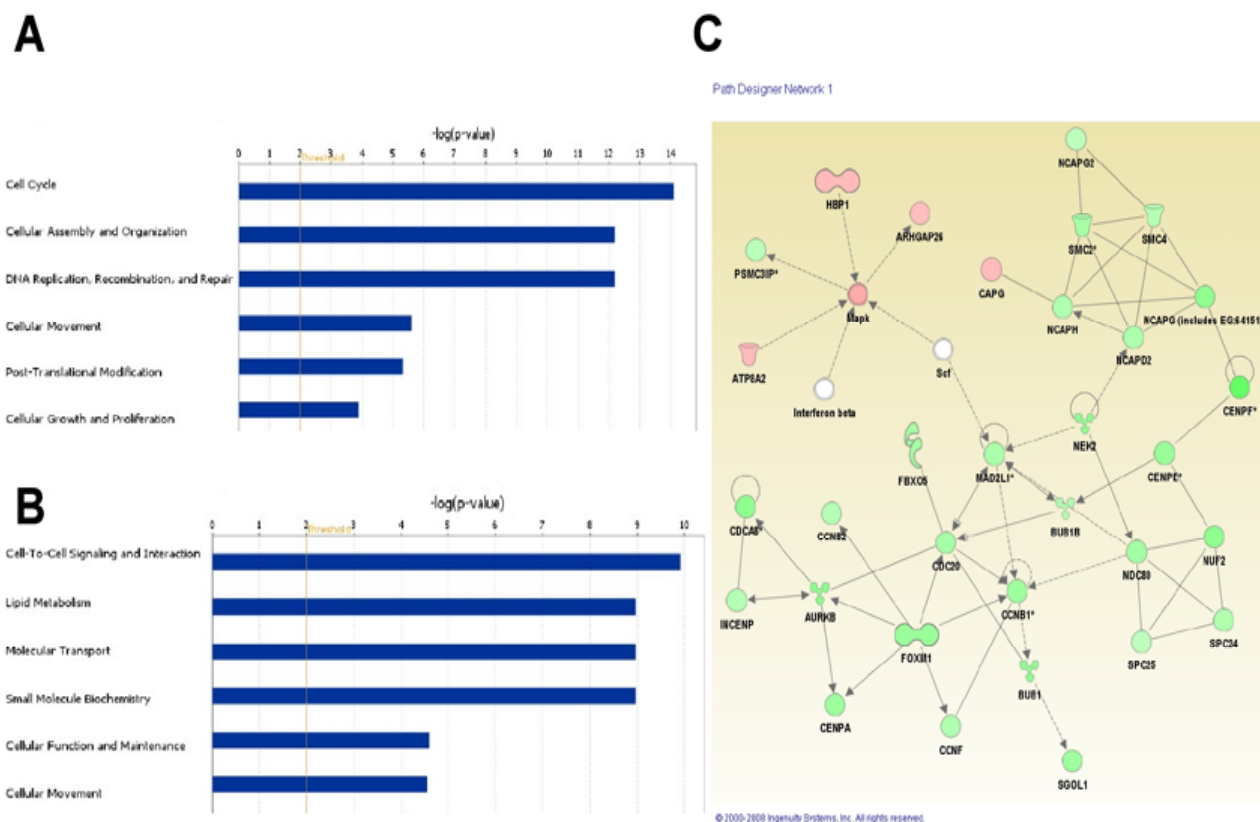
**Figura17. En ausencia de Cdk's de interfase los MEFs se acumulan en G2. A.** Comparación de la distribución de las fases de ciclo en MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> (negro) y MEFs TKO (blanco). **B.** Porcentaje de células positivas para el marcador mitótico pSer10-Histona H3 (H3P). **C.** Distribución de las fases del ciclo celular en MEFs TKO transducidos con virus control (blanco) o T121 (barras laterales). (n=3 en todos los casos) Barras de error en todos los apartados= Desviación estándar.

Esto nos hizo pensar en que la ausencia de Cdk2, Cdk4 y Cdk6 podría estar causando estrés replicativo y que como consecuencia se activaba el Checkpoint de G2/M acumulando las células en esa fase del ciclo. Análisis tanto del marcador  $\gamma$ -H2AX (fig.18A). como de los transductores de la señal de daño al ADN: ATM y Chk1 (fig.18B) nos indicaron que no era el caso.



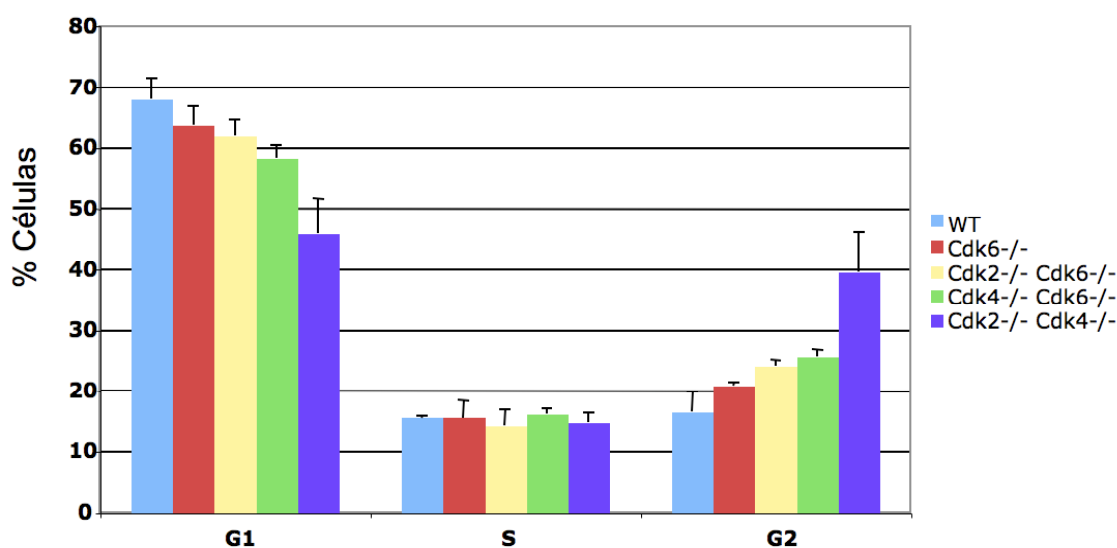
**Figura 18. Las células TKO no presentan preactivación de checkpoints.** **A.** Intensidad del marcador de daño al ADN  $\gamma$ -H2AX en células  $Cdk6^{-/-}$  (negro) o TKO (blanco). Como control positivo se muestran células  $Cdk6^{-/-}$  irradiadas con 8Gy. **B.** Western Blot de los marcadores de activación de las vías de ATM (pATM) y ATR (pChk1). Como control positivo se muestran células sometidas a  $\gamma$ -irradiación (8Gy) o radiación UV (20J).

Estos resultados nos hicieron retomar la idea de que el defecto era causado por una transcripción inefficiente. Si ese era el caso, quizás podríamos averiguar qué genes podrían ser responsables de ello mediante micromatrices de ADN. Así procedimos a analizar genes que cambiaban su expresión en los MEFs TKO vs  $Cdk6^{-/-}$  (fig.19A) así como MEFs TKO transducidos con T121 con respecto a los MEFs  $Cdk6^{-/-}$  transducidos con T121 (fig.19B). El análisis de los resultados indica que los MEFs TKO tienen una menor expresión de genes diana de E2F como FoxM y todos los genes de su ruta (fig.19C) y otras proteínas como aquellas de la familia CENP, ADN polimerasa, proteínas de la familia FANC, Aurora quinasa y otras (fig. 19A). La gran mayoría de esos genes recuperan sus niveles de expresión en los MEFs TKO transducidos con T121 (fig. 19B) también FoxM y todos los genes de su ruta. No hemos podido encontrar pistas de genes que no recuperen su nivel de expresión al transducir con T121 y que por tanto puedan ser responsables de la acumulación de los MEFs TKO en G2 como consecuencia, probablemente del ruido inherente a este sistema de análisis.



**Figura19. Análisis mediante micromatrices de ADN de la expresión génica de los MEFs TKO. A.** Principales rutas cuyo nivel de expresión varía en MEFs TKO con respecto a MEFs  $Cdk6^{-/-}$ . **B.** Principales rutas cuyo nivel de expresión varía en MEFs TKO transducidos con T121 vs MEFs  $Cdk6^{-/-}$  transducidos con T121. **C.** El nivel de expresión de dianas de E2F como FoxM y todas las proteínas de su ruta se encuentra reducido (color verde) en las células TKO.

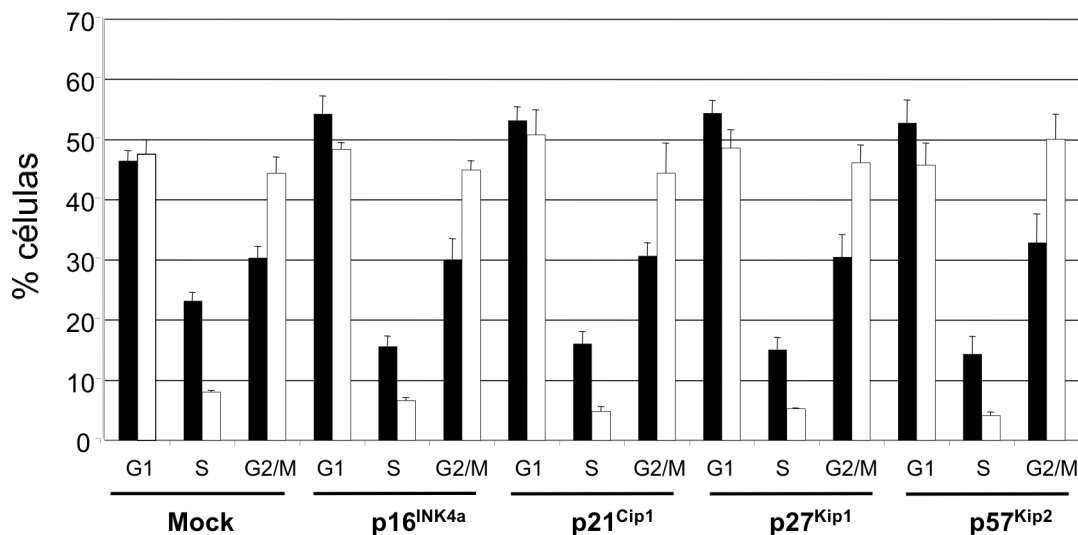
A continuación, para averiguar si la acumulación en G2 se producía ya con la ausencia combinada de sólo dos Cdks de interfase, nos propusimos analizar el perfil de ciclo de MEFs con distintas deficiencias combinadas en Cdks de interfase. Como se puede ver en la figura 20. Según se va reduciendo la actividad Cdk paulatinamente, se produce un incremento en la fase G2 del ciclo, siendo el aumento más dramático el provocado por la ausencia de Cdk2 y Cdk4 que puede ser comparable al presente en las células TKO. Esto nos hace formular diversas hipótesis que analizaremos en el apartado de discusión de la tesis.



**Figura 20. Distribución de las fases del ciclo celular en ausencia de las distintas Cdks de interfase.** Se analizó el perfil de ciclo celular mediante Yoduro de Propidio y cuantificación por FACS de MEFs primarios asincrónicos de los genotipos señalados (n=3). Barras de error = Desviación estándar.

### 2.2.5 Efecto de la sobreexpresión de inhibidores de Cdks de las familias INK4 y Cip/Kip en la distribución del ciclo celular de los fibroblastos TKO

Nos propusimos estudiar el efecto que causaba en el ciclo celular la sobre-expresión del inhibidor de Cdks de la familia INK4, p16<sup>INK4a</sup>, cuyas dianas naturales son Cdk4 y Cdk6, así como de p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>, los tres miembros de la familia Cip/Kip de inhibidores de Cdks cuyas dianas principales son Cdk2 y Cdk1. Para ello utilizamos retrovirus que permitían la expresión constante de las proteínas cuyo efecto queríamos analizar infectando MEFs primarios creciendo asincrónicamente. Como se puede ver en los perfiles de la figura 21, p16<sup>INK4a</sup> no parece alterar la distribución del ciclo en los MEFs TKO al estar ausentes sus dianas Cdk4 y Cdk6. Sin embargo, p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup> reducen el porcentaje de células en S y provocan un aumento en G1, indicando que posiblemente los complejos de Cdk1 con las Ciclinas de G1/S pasen a ser dianas de estas dos moléculas. Sorprendentemente, p57<sup>Kip2</sup> causa aumento en G2 en los MEFs TKO a diferencia de los MEFs control. Si bien no tenemos una hipótesis definitiva, este resultado nos hace pensar que los complejos de Cdk1 con las Ciclinas de G1/S no son reconocidos por p57<sup>Kip2</sup> a diferencia de los complejos de Cdk4 y Cdk2 que sí se pueden formar con estas Ciclinas en los MEFs control y que está descrito son diana de p57<sup>Kip2</sup> (Sherr y Roberts, 2004).

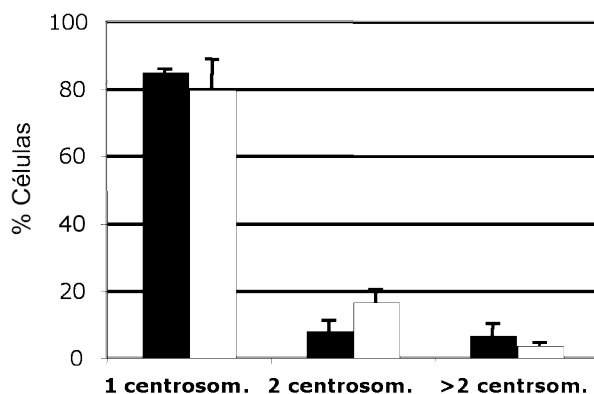


**Figura21. Efecto de los inhibidores de la familia INK/CIP-KIP en MEFs TKO.** Análisis del perfil de ciclo de MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> (negro) y TKO (blanco) transducidos con retrovirus expresando las proteínas indicadas. (n=3). Barras de error = Desviación estándar.

### 2.2.7 Duplicación del centrosoma en ausencia de las tres Cdks de interfase

Numerosos estudios han atribuido a los complejos Cdk2-Ciclina A/E un papel determinante en el ciclo de división centrosómica (Lacey *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Meraldi *et al.*, 1999). Así por ejemplo, se ha visto que la inhibición de Cdk2 por sobre-expresión de p21<sup>Cip1</sup> o de un dominante negativo, bloqueaba la división de los centrosomas en células CHO (Meraldi *et al.*, 1999). La implicación de Cdk2 en este proceso pasaría por la capacidad de esta quinasa de regular, vía fosforilación, la localización y estabilidad de ciertos componentes de la maquinaria centrosomal. Análisis sin publicar realizados en este laboratorio demuestran que Cdk2 no es esencial para la replicación centrosomal posiblemente porque pueda estar compensado por alguna de las otras Cdks de interfase. Nos propusimos analizar el estado de los centrosomas en los MEFs TKO mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la  $\gamma$ -tubulina de la matriz pericentriolar. De esta manera conseguimos detectar la presencia de centrosomas tanto en células TKO como silvestres, sin que pudiéramos constatar ningún tipo de alteración significativa (fig.22). Tan sólo se aprecia un ligero aumento de células con dos centrosomas, muestra probablemente, de la acumulación en G2 de las células de este genotipo. Esto resultados nos hacen pensar que el ciclo del centrosoma también puede ser conducido con aparente normalidad por Cdk1.





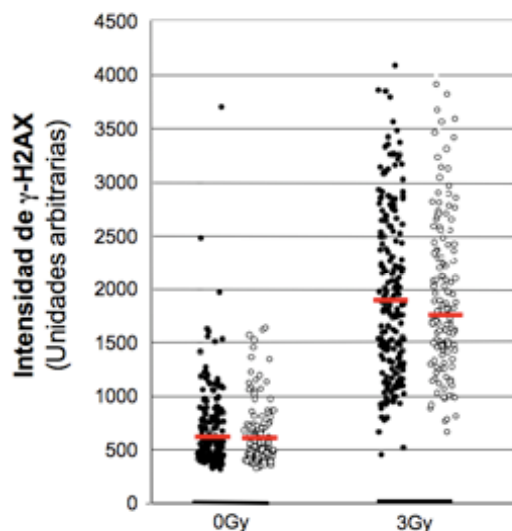
**Figura22. Número normal de centrosomas en MEFs TKO.** Porcentaje de células con el número de centrosomas reseñado. MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> (negro) o TKO (blanco). (n=3 Cdk6<sup>-/-</sup>; n=5 TKO) Barras de error = Desviación estándar.

### 3. RESPUESTA FRENTE AL DAÑO EN EL ADN EN AUSENCIA DE LAS CDKS DE INTERFASE

#### 3.1 Análisis de las rutas de señalización de daño al ADN en ausencia de Cdk de interfase

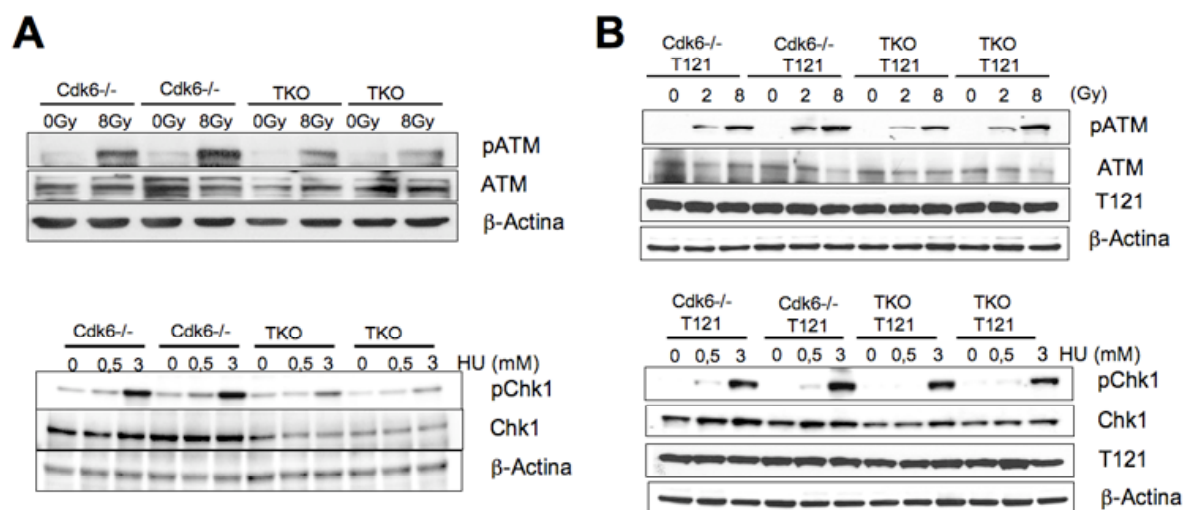
Como mencionamos en la introducción, el papel más importante de las Cdk en la respuesta frente a daño al ADN, es el de ser dianas del checkpoint con objeto de parar el ciclo y así ser capaces de reparar el daño (Zhou y elledge, 2000). Sin embargo, en los últimos años han surgido evidencias de que las Cdk también pueden regular la señalización del daño (Yata *et al.* 2008). Ejemplo de ello es el que la proteína Atrip sea fosforilada por Cdk2 (Myers *et al.*, 2007). Por ello quisimos comprobar el estatus de las vías de señalización de daño en los MEFs TKO.

Una vez la célula ha detectado un DSB, se produce la activación de los transductores de señal ATM y ATR. Estos fosforilarán a la histona H2AX (pasando a denominarse  $\gamma$ -H2AX) para inducir un cambio en la cromatina que reclute a todas las proteínas necesarias para una eficiente señalización del checkpoint y una correcta reparación del daño (Kinner *et al.*, 2008). Por tanto, H2AX es un marcador de la funcionalidad de la ruta. Por ello procedimos a su análisis en los MEFs TKO. Como se puede observar en la figura 23, la intensidad de señal de  $\gamma$ -H2AX en los MEFs TKO es prácticamente idéntica a la señal de los MEFs control tras irradiar con 3 Gy.



**Figura23. Activación de  $\gamma$ -H2AX tras irradiación.** Mediante inmunofluorescencia y microscopía de alto rendimiento se analizó la intensidad de  $\gamma$ -H2AX por célula, en células sin irradiar o irradiadas (3Gy). Los MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> se representan en negro y los MEFs TKO en blanco.

Los resultados del análisis de  $\gamma$ -H2AX nos hacían pensar que la señalización del daño sucedía correctamente, por lo que pasamos a analizar a los dos principales transductores de la señal de daño, ATM y ATR. Como se puede observar en la figura 24A, ATM se activa (fosforilación en Ser1981) en respuesta a irradiación en los MEFs TKO. De igual modo, la vía de ATR es funcional como se puede ver por la activación de Chk1 (fosforilación en Ser345) tras inducir daño con Hidroxiurea (fig.24A). No obstante, se puede apreciar que la intensidad de la banda fosforilada de ATM y Chk1 en los MEFs TKO es inferior a la de sus controles (fig.24A). En el caso de Chk1 se sabe que es una proteína regulada por el ciclo celular, (Kaneko *et al.*, 1999 ; Ken *et al.*, 2002) de tal modo que la ineficiente desactivación de Rb que sucede en los MEFs TKO podría repercutir en un menor nivel de Chk1 total disponible para fosforilarse. Por otro lado, los niveles de ATM no se sabe que estén regulados por el ciclo celular, pero puesto que parte de la activación de esta proteína depende de la activación de ATR, podría ser un efecto indirecto. También una menor proliferación puede conllevar un retraso en la detección del daño y por tanto una menor activación de ATM y ATR. Para separar los efectos dependientes de ciclo o de proliferación con respecto a los dependientes de actividad Cdk, repetimos el experimento con MEFs transducidos con T121, lo cual iguala el nivel de proliferación como está descrito en el apartado 2.2.1 de estos resultados (fig.14C). Como se puede observar en la figura 24B, los niveles de fosforilación de ATM y Chk1 se recuperan notablemente, lo que indica que el efecto real de la ausencia de Cdks en la activación de estas proteínas es menor y probablemente insignificante.



**Figura24. Activación de transductores de señal de los checkpoints en respuesta a daño al ADN en ausencia de Cdks de interfase.** A. Activación de las vías de ATM y ATR (Chk1) en respuesta a daño. Se usaron dos clones para cada genotipo. B. Mismo análisis mostrado en A realizado con MEFs transducidos con T121. El grado de activación en este caso es equiparable entre MEFs control y TKO.

### **3.2 Funcionalidad de los checkpoints en ausencia de las tres Cdks de interfase**

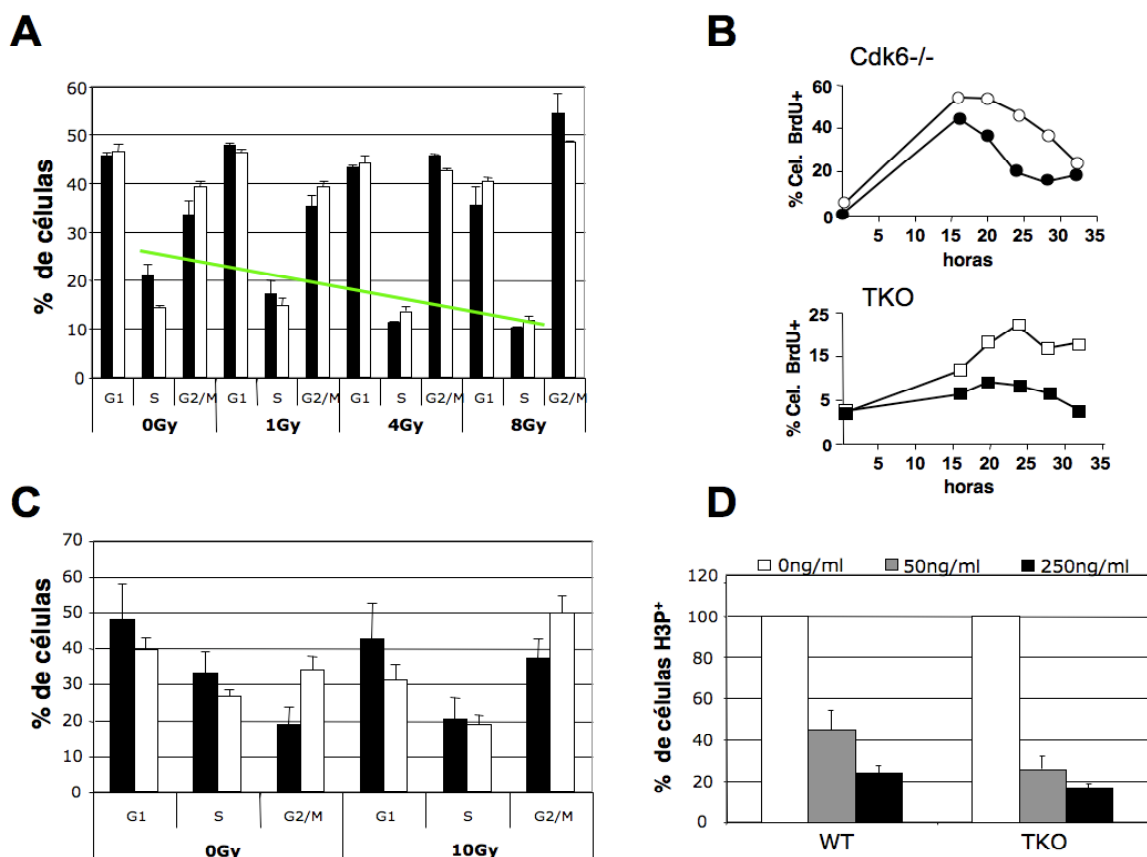
La función principal del checkpoint consiste en parar el ciclo celular para que el daño no se propague y la célula disponga de tiempo para repararlo. En los apartados anteriores hemos comprobado que la señalización del checkpoint era correcta en ausencia de Cdks de interfase y ahora nos propusimos comprobar si como resultado, la parada tanto de G1/S como de G2/M era funcional.

#### **3.2.1 El checkpoint de G1/S es funcional en ausencia de las Cdks de interfase**

Como se puede ver en la figura 25A, con un análisis estándar del checkpoint que consiste en irradiar con dosis crecientes y esperar 10 horas, se produce una disminución de células en fase S. Para ensayar con mayor claridad la funcionalidad del checkpoint, procedimos a arrestar las células en G0 retirándoles el suero y a irradiarlas tras su re-estimulación con suero. De este modo, también observamos una disminución de células entrando en S tanto en las células TKO como en sus controles (fig.25B). Todo ello indica que el Checkpoint de G1/S es funcional en ausencia de las Cdks de interfase.

#### **3.2.2 El checkpoint de G2/M es funcional en ausencia de las Cdks de interfase**

Para comprobar la funcionalidad del checkpoint de G2/M procedimos a irradiar las células con distintas dosis de rayos- $\gamma$  y a analizar el perfil de ciclo 24 horas más tarde. Como se puede apreciar en la figura 25C, se produce una disminución de células en fase S y un incremento de células en fase G2 en ambos genotipos, control y TKO. Como ensayo adicional, se sabe que una prueba de funcionalidad del Checkpoint de G2/M, es que se produzca reducción en la entrada de células en mitosis tras irradiar. Como marcador mitótico empleamos nuevamente la fosforilación de la HistonaH3. Como se puede ver en la figura 25D, 45 minutos tras irradiar, se produce una reducción en el porcentaje de células que entran en mitosis tanto en los MEFs TKO como control siendo quizás la reducción de manera incluso superior en el TKO. Esto prueba que el checkpoint de G2/M también es funcional en ausencia de las Cdks de interfase.



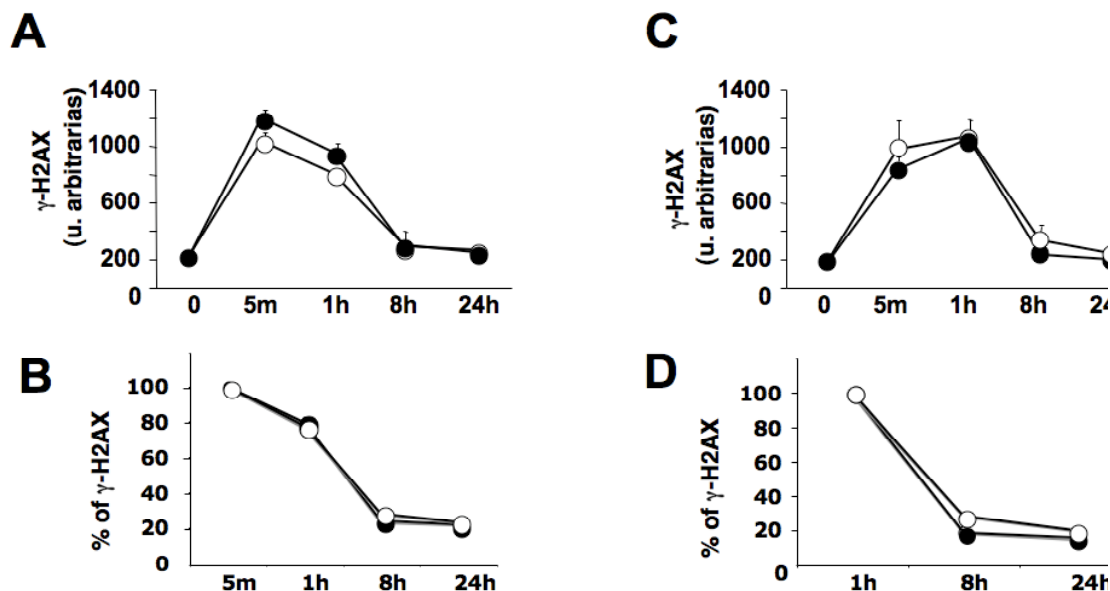
**Figura 25. Los checkpoints de G1/S y G2/M son funcionales en ausencia de las Cdks de interfase. A. y B. Checkpoint de G1/S (n=3) A.** Distribución de las fases del ciclo celular tras irradiar con las dosis indicadas y esperar 10 horas MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> (negro) o MEFs TKO (blanco) **B.** Entrada en S desde G0 tras irradiación con 0Gy (blanco) o 8Gy (negro). **C y D. Checkpoint de G2/M (n=3) C.** Distribución de las fases del ciclo celular tras irradiar con la dosis indicada y esperar 24 horas MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> (negro) o MEFs TKO (blanco). (n=3 para Cdk6<sup>-/-</sup>; n=5 para TKO) **D.** Porcentaje de células positivas para pSer10-HistonaH3 tras inducir daño al ADN con las dosis indicadas de Neocarzoestatina (n=3). Barras de error en todos los apartados= Desviación estándar.

### 3.3 Análisis de la implicación de las Cdks en reparación del ADN dañado

En los últimos años han surgido numerosas pruebas que demuestran que las Cdks están implicadas en la regulación de la reparación del ADN así como en la elección de la vía por la cual se lleva a cabo dicha reparación (Sonoda *et al* 2006 ; Yata *et al.* 2008). Nuestros MEFs deficientes en Cdks de interfase constituyen un modelo idóneo para estudiar la contribución real de dichas Cdks a las vías de reparación.

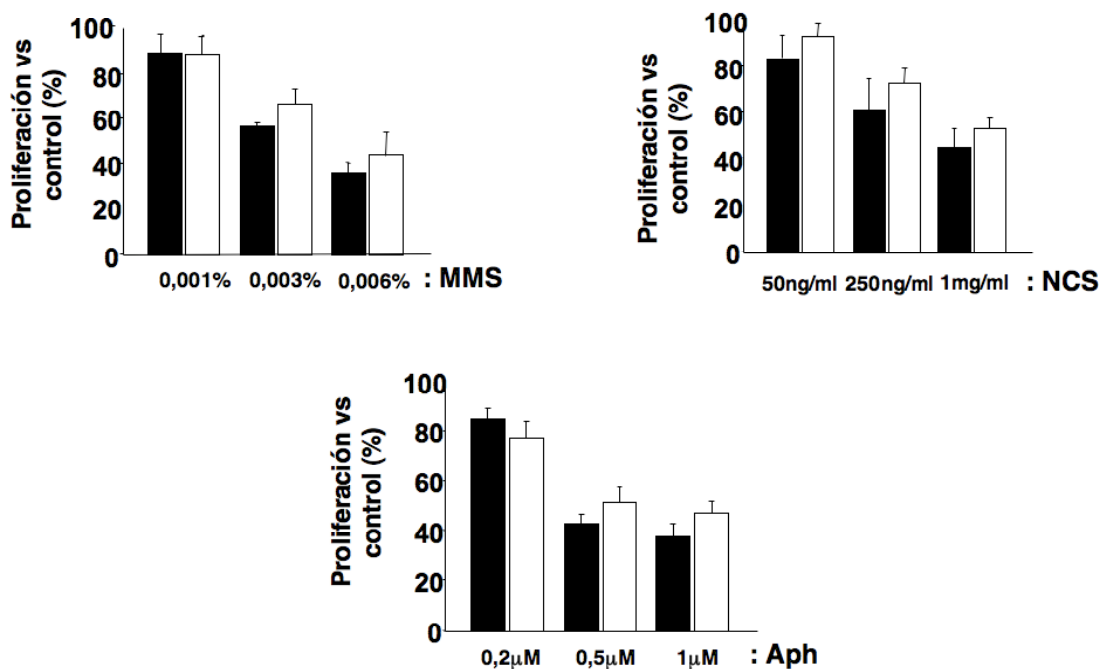
La desaparición de la señal de  $\gamma$ -H2AX tras su inducción mediada por daño al ADN es el ensayo más aceptado para estudiar la reparación del ADN (Sedelnikova *et al.*, 2003 ; Riballo *et al.*, 2004 ; Bonner *et al.*, 2008), por tanto procedimos a analizar la respuesta a daño de nuestras células siguiendo esta técnica. Como se puede ver en la figura 26A. Tan solo existe una ligera diferencia en el máximo de intensidad de la señal de  $\gamma$ -H2AX a favor de los MEFs control tras irradiar. Si tomamos el punto máximo de la señal como el 100%, se aprecia que la cinética del apagado de la

señal es idéntica en el genotipo TKO y el control (fig.26B). Siendo más, el uso de los MEFs transducidos con T121 (fig.26C,D) demuestra por un lado, que la pequeña diferencia de activación de H2AX era debida tan solo a la menor proliferación de estas células y que por otro, la cinética de reparación es idéntica en ambos genotipos.



**Figura 26. La reparación procede con normalidad en ausencia de Cdks de interfase.** A y C: Evolución de la intensidad de señal de  $\gamma$ -H2AX tras irradiar con 10Gy MEFs Cdk6<sup>-/-</sup>(negro) o TKO (blanco) (A) y MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> transducidos con T121 (negro) o MEFs TKO (blanco) transducidos con T121 (C). B y D Desaparición de la señal de  $\gamma$ -H2AX tomando como 100% de la señal el máximo de intensidad alcanzado en la figura A (B) o en la figura C (D).

Puesto que la reparación parecía funcional en el análisis de  $\gamma$ -H2AX, procedimos a comprobarlo mediante un ensayo de hipersensibilidad a daño continuado. Si una célula tiene un sistema de reparación ineficiente y es sometida a daño continuado, la acumulación del mismo, será tal que la hará inviable haciendo que el cultivo disminuya su proliferación. Por tanto procedimos a utilizar en MEFs TKO y Cdk6<sup>-/-</sup> varias dosis de tres compuestos que causan daño al ADN: Neocarcinoestatina (NCS), Afidicolina (Aph) y Metilmetanosulfonato (MMS). Como se puede apreciar en la figura 27, no se produce en ningún caso una disminución en la proliferación del cultivo del TKO mayor a la de los MEFs control, lo que confirma la eficacia de los sistemas de reparación en ausencia de las Cdks de interfase.



**Figura27. Las células sin Cdks de interfase no son hipersensibles a daño al ADN.** Se crecieron durante cuatro días MEFs primarios Cdk6<sup>-/-</sup>(negro) o TKO( blanco) en presencia de los agentes causantes de daño al ADN: Metilmetanosulfonato (MMS) Neocarcinoestatina (NCS) y Afidicolina (Aph). Las gráficas muestran el porcentaje de inhibición del crecimiento de los MEFs con cada concentración de droga indicada con respecto a su control sin tratar.

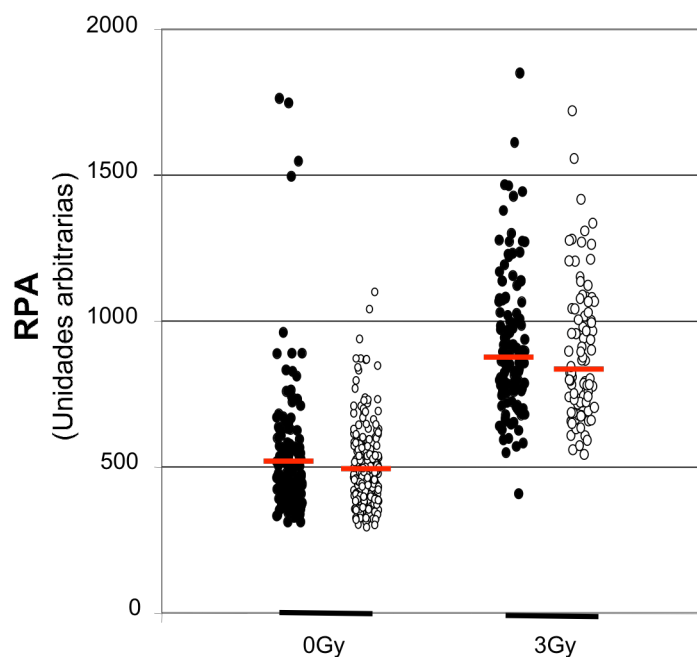
### 3.3.1 La Recombinación Homóloga puede ser dirigida por las Cdks de interfase

El sistema de reparación que resulta más eficiente depende de la fase del ciclo en la que se encuentra la célula. De este modo, si bien la reparación por NHEJ es efectiva, también puede producir pequeñas pérdidas de información genética. Por contra, la reparación mediante HR sólo debe producirse cuando en la célula hay disponible una cromátida hermana que usar como molde para la reparación. Reparar mediante HR en G1 sería fuente de inestabilidad genómica y reparar mediante NHEJ durante S/G2 no sería óptimo. Esto hizo pensar desde hace tiempo que podría haber, sobre todo en el caso de HR una regulación dependiente de Cdk, para así restringirla a la fase del ciclo que le corresponde (Yata *et al.*, 2008).

Sabiendo de antemano que los MEFs TKO reparaban con igual eficiencia que sus controles, nos planteamos analizar si en concreto la recombinación homóloga también se producía de forma eficiente o si por contra la ausencia de diferencia global de reparación se producía por una compensación ejercida por NHEJ.

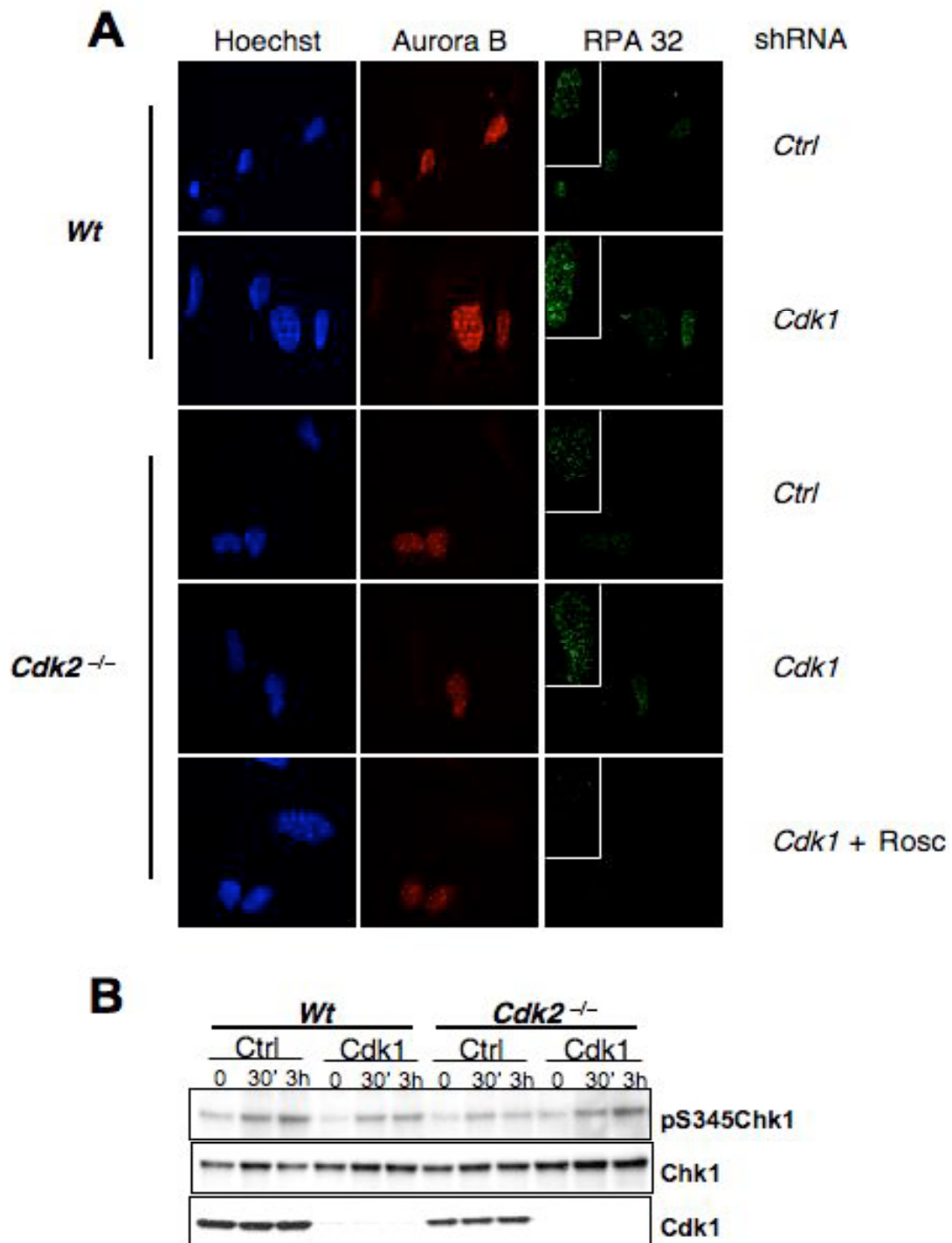
Como se ha descrito en la introducción, la formación de focos de RPA es un marcador inequívoco de la resección del DSB que se produce como primer paso imprescindible para que se pueda ejecutar la reparación por HR. Por tanto decidimos cuantificar mediante microscopia de gran productividad (high-throughput) la intensidad de los focos de RPA tras irradiar nuestras

células. Como se puede apreciar en la figura 28, no existen prácticamente diferencias entre las células TKO y las control.



**Figura28.** La formación de focos de RPA procede con normalidad en ausencia de las Cdks de interfase. Se irradiaron con 3Gy MEFs Cdk6<sup>-/-</sup> (negro) y MEFs TKO (blanco) y se cuantificó la señal de RPA34 mediante microscopía de alta productividad. En rojo se muestra la media de intensidad.

Las Cdks responsables de la actividad en Stardío/G2 del ciclo son Cdk1 y Cdk2, por tanto pensamos que posiblemente eran estas Cdks las responsables de la inducción de la HR. Por ello usamos un shRNA muy eficiente contra Cdk1 en células silvestres. Como se puede ver en la figura 29, la actividad Cdk1 no es esencial para la formación de focos de RPA. Por si la quinasa Cdk2 estaba compensando la ausencia de Cdk1, usamos este mismo shRNA en células Cdk2<sup>-/-</sup>. Como se puede ver en la misma figura, también en esas condiciones se formaban focos de RPA y siempre en células positivas para el marcador de G2, AuroraB. Sin embargo, sí que es requerida actividad Cdk en este proceso, puesto que el tratamiento de las células con el inhibidor de Cdks, Roscovitina, elimina la formación de los focos de RPA (fig.29). A continuación, procedimos al análisis de la activación de un marcador de activación de ATR, Chk1 en estas condiciones. Como se puede ver en la figura 29B, la activación de Chk1 también se produce en ausencia de Cdk1 y Cdk2. Estos resultados en conjunto nos hacen pensar que las Cdks de interfase pueden también conducir el proceso de recombinación homóloga.

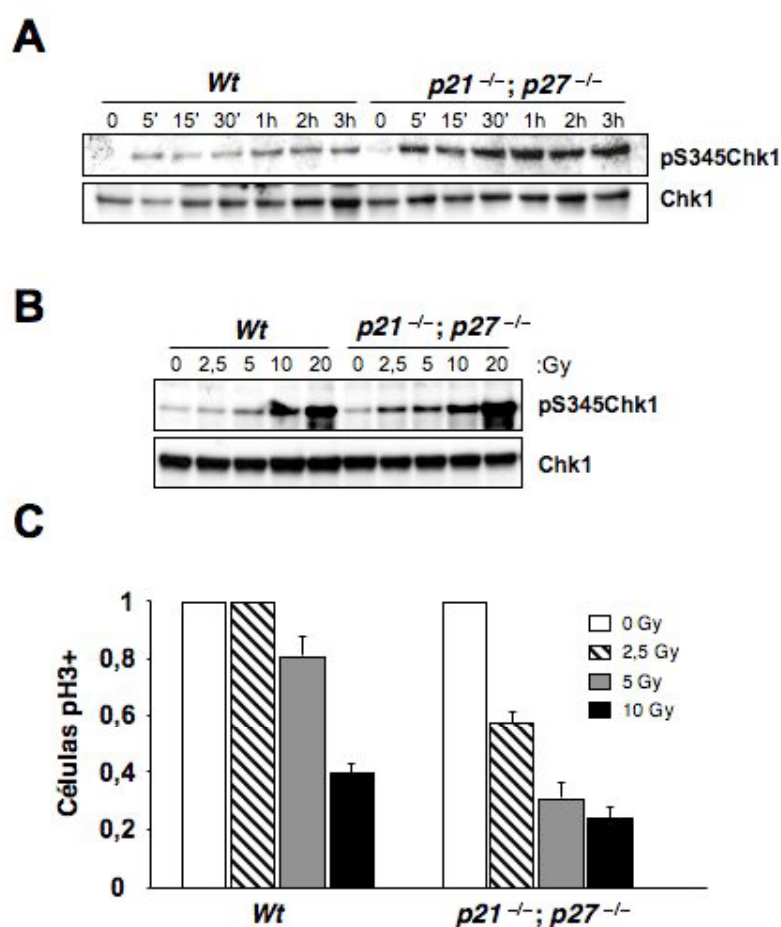


**Figura29. Cdk1 y Cdk2 no son necesarias para la reparación por HR.** A. Tanto las células silvestres (wt) como las *Cdk2<sup>-/-</sup>* forman focos de RPA siendo tratadas o no con un shRNA contra Cdk1 tras irradiar con 30Gy. Los focos sólo se producen en células positivas para Aurora B, (un marcador de G2) y son eliminados por la presencia del inhibidor de Cdks, Roscovitina (Rosc) B. El nivel de activación de Chk1, es similar con y sin shRNA contra Cdk1 a distintos tiempos tras irradiar con 30Gy.



### 3.3.2 El nivel total de actividad Cdk controla la reparación por HR y el Checkpoint de G2/M.

Como hemos visto, el proceso de reparación por HR puede ser dirigido por cualquier Cdk. Nos preguntamos si de igual manera que un menor nivel de actividad quinasa (como muestra el experimento con Roscovitina) elimina la reparación por esta vía, si la existencia de una mayor actividad Cdk la potenciaría. Para comprobarlo usamos MEFs KO para dos miembros de la familia Cip/Kip, p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>. Tras irradiar con 30Gy observamos que a cualquiera de los tiempos analizados, la activación de Chk1 era superior en los MEFs p21<sup>-/-</sup>p27<sup>-/-</sup> (fig.30A). De igual modo, 45 minutos tras irradiar, las células con mayor actividad Cdk demostraron ser capaces de activar Chk1 a dosis más bajas de irradiación que las células silvestres (fig.30B). Si la activación de las vías de señalización es más sensible e intensa con alta actividad Cdk, lo lógico sería que el Checkpoint fuera más eficiente. Un experimento en el cual se cuantificó mediante FACs el porcentaje de células positivas para el marcador mitótico fosfo-histona H3 (Ser10), demostró que a dosis menores de radiación gamma, los MEFs p21<sup>-/-</sup>p27<sup>-/-</sup> activaban con mayor eficiencia el checkpoint, puesto que el porcentaje de células en mitosis se reducía sensiblemente más en estas células a dosis inferiores (fig.30C).



**Figura30. Una mayor actividad Cdk favorece la reparación mediante HR. A.** MEFs p21<sup>-/-</sup>p27<sup>-/-</sup> activan con mayor intensidad Chk1 en los tiempos indicados tras irradiar con 30Gy **B.** Los MEFs p21<sup>-/-</sup>p27<sup>-/-</sup> activan Chk1 con una menor dosis de irradiación 45 minutos tras irradiar con 30Gy. **C.** El Checkpoint de G2/M responde con mayor intensidad y con menos dosis de irradiación. El gráfico muestra la reducción de células positivas para fosfoH3 (Ser10) 45 minutos tras irradiar con las dosis indicadas, células silvestres (WT) o p21<sup>-/-</sup>p27<sup>-/-</sup> (n=3).



# Discusión



## 1. Cdks y ciclo celular, evidencias bioquímicas y genéticas

La progresión 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. A lo largo de la evolución, y según han avanzado en complejidad, los organismos han ido desarrollando genomas más elaborados. De este modo, funciones que en organismos sencillos son desempeñadas por un único gen, en organismos más complejos es desempeñada por una familia génica. El control del 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. Cdc2 en *S. pombe* y Cdc28 en *S. cerevisiae* (Morgan, 1996). Un peldaño más arriba en cuanto a complejidad, el nematodo *C. elegans* está dotado con una Cdk de G1, Cdk4, adicional a la mitótica. En *Drosophila melanogaster* ya aparecen varias Cdks, específicas para cada fase del ciclo. Así, a parte de Cdk1, podemos encontrar a Cdk4 y a Cdk2 como las quinasas encargadas de regular el paso a través de G1 y de S respectivamente (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. 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 (fig.1).

A este modelo de ciclo celular descrito para mamíferos se ha llegado a través de numerosos estudios *in vitro*. Por ejemplo, experimentos en los que se sobre-expresaba una forma catalíticamente inactiva de Cdk2 detenía la proliferación de las células en cultivo en la fase G1 del ciclo. De igual modo, la microinyección de anticuerpos contra Cdk2, Ciclina E o Ciclina A bloqueaba el inicio de la síntesis de ADN (Tsai *et al.*, 1993; Van den Heuvel y Harlow, 1993; Hu *et al.*, 2001; Ohtsubo *et al.*, 1995). Todo ello estableció a Cdk2 como principal regulador de la transición G1/S y progresión a través de S. De igual modo, la inyección de anticuerpos neutralizantes contra Cdk1 en células de mamífero inhibía la mitosis sin tener efecto en la replicación del ADN (Riabowol *et al.* 1989) y el uso de un mutante de Cdk1 sensible a temperatura en células de ratón que no afectó a la transición G1/S pero sí arrestaba las células en

G2 (Mineo *et al* 1986 ;Th'ng *et al* 1990). Todo ello adscribió a Cdk1 a G2/M. Este modelo permaneció intacto hasta la aparición de modelos de ratón genéticamente modificados.

El desarrollo experimentado por las técnicas de ingeniería genética a mediados y finales de los años noventa permitió la generación de modelos murinos donde la expresión génica de las Cdks quedaba anulada gracias a la inserción de mutaciones deletéreas en los loci correspondientes a dichos genes. De esta forma se podía estudiar el auténtico papel que desarrollan estas proteínas en el ciclo celular de mamíferos. Los resultados obtenidos, han generado nuevos interrogantes y replantean, o al menos flexibilizan el modelo de ciclo celular existente. De esta manera, la generación de varios modelos KO de Cdk4 (Rane *et al*, 1999; Tsutsui *et al*, 1999) puso en entredicho el aparente 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 las células  $\beta$  pancreáticas, y lactotrofos pituitarios. 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. 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 los individuos debido a fallos en la profase I de la división meiótica.

La ausencia de mayores defectos provocados por la deficiencia en alguna de las Cdks que regulan la interfase del ciclo celular condujo a la hipótesis de que estas quinastas podrían ejercer papeles compensatorios entre sí. La generación de animales doblemente deficientes en Cdks de interfase permitió establecer en qué medida se produce esta compensación. Si bien existía cooperación entre Cdk4 y Cdk6, puesto que los animales Doble KO en estas quinastas provocaba letalidad embrionaria (E15.5), esta compensación sólo se producía en el tejido hematopoyético. La organogénesis del resto de tejidos era completamente normal (Malumbres *et al.*, 2004). Del mismo modo, la generación de un animal Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> (Malumbres *et al.*, 2004) puso de relieve la falta de nuevos defectos que sumar a aquellos producidos por la ausencia individual de Cdk2 y Cdk6. Por tanto, Cdk2 y Cdk6 no realizan papel compensatorio alguno en las células murinas. Para comprobar posibles roles compensatorios entre las Cdks de interfase, los Drs. Cédric Barrière y David Santamaría generaron en nuestro laboratorio un modelo con doble deficiencia en las principales Cdks de interfase, Cdk2 y Cdk4 y un modelo triple Knock out para Cdk2,Cdk4 y Cdk6. El análisis de ambos es discutido a continuación.

## 2. Ciclo celular en ausencia de Cdk2 y Cdk4

Cdk2 y Cdk4 son las principales quinastas de las fases G1 y S del ciclo celular. Los modelos animales Knock out sencillos de Cdk2 y Cdk4 no parecen tener prácticamente problemas en el desarrollo del ciclo celular al margen de tipos celulares concretos. En el doble KO de Cdk4 y

Cdk6 se había comprobado que Cdk2 compensaba la ausencia de estas dos quinasas uniendo Ciclina D y fosforilando a Rb (Malumbres *et al.*, 2004). Para comprobar la relevancia de la compensación entre estas dos quinasas, los Drs. Cédric Barrière y David Santamaría generaron un modelo con doble deficiencia en Cdk2 y Cdk4. Los animales Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> fallecen justo después de su nacimiento debido principalmente a problemas cardiacos (Barriere *et al.*, 2007), si bien el resto de los tejidos parecen tener un desarrollo correcto, lo que demuestra que esta compensación entre Cdk2 y Cdk4 sólo es esencial en este tejido. Los niveles de las principales proteínas implicadas en ciclo celular no parecen mostrar cambios significativos en sus niveles (fig.2A). El análisis del estado de fosforilación de Rb, demostró que estaba claramente hipofosforilado (fig.2B). El nivel de hipofosforilación de Rb en estas células era tan notable que hacía sorprendente que los embriones pudieran completar el desarrollo. Por ello analizamos algunos de los sitios fosfoespecíficos de Rb caracterizados funcionalmente como son las Ser807, Ser811, Ser780 y Ser608. Todos ellos muestran niveles de fosforilación muy similares a los que encontramos en controles silvestres (fig.2B). Rb cuenta con 16 sitios potencialmente fosforilables. la mayoría de los cuales se han visto fosforilados *in vivo* (Tamrakar *et al.*, 2000). Los fosforilación de los residuos Ser807/811 se ha comprobado que modifica drásticamente la conformación de Rb (Driscoll *et al.*, 1999). Del mismo modo, se ha comprobado *in vivo* que pRB fosforilado en Ser780 no es capaz de unir E2F (Kitagawa *et al.*, 1996) y que la fosforilación en Ser608 deshace el complejo pRB-E2F (Knudsen *et al.*, 1997) Esto explicaría que a pesar de la clarísima hipofosforilación de Rb en los DKO, el ciclo pueda progresar. Si bien Rb está hipofosforilado, hay unos residuos de gran relevancia funcional que sí son fosforilados. Podemos concluir por tanto, que parte de los residuos fosforilables de Rb son prescindibles para inactivar a Rb. La pregunta ahora es quien está fosforilando a Rb en lugar de Cdk4 y Cdk2. Cdk4 puede ser sustituida fácilmente por Cdk6 y prueba de ello es que en extractos de embriones Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> encontramos más Ciclina D2 unida a Cdk6 que en aquellos que proceden de embriones silvestres (fig.2C). En el caso de Cdk2, Cdk1 es la encargada de unir a Ciclina E1 (fig.2C) sustituyéndola en sus funciones en G1/S. Además encontramos también a Cdk1 uniendo a Ciclina D (fig. 4B). Estos resultados prueban que Cdk1 puede participar en las primeras fases del ciclo celular, algo desconocido hasta ahora.

Unos meses antes a la publicación de nuestros resultados, el grupo de Philip Kaldis publicó otro modelo con deficiencia combinada en Cdk2 y Cdk4 (Berthet *et al.*, 2006). El fenotipo que muestran en dicha publicación es diferente al que observamos nosotros y sobre todo, la interpretación de los resultados varía notablemente. Los animales DKO generados en nuestro laboratorio llegan a nacer mientras que los generados por Berthet y colaboradores mueren en torno al día E15.5, si bien un pequeño porcentaje llega hasta E17.5-18.5. En ambos casos, la anomalía causante de la muerte se asigna a problemas cardiacos. El análisis bioquímico de estos animales muestra en el caso de Berthet y col. que los niveles de Cdk1 así como de otras proteínas reguladas

por factores de transcripción E2F, disminuyen notablemente en los embriones DKO según avanza la gestación. Nosotros no observamos diferencias en el nivel de Cdk1 ni en otros elementos regulados por E2Fs como Ciclina A2 (fig.2A). Ni tan siquiera a día E16.5 de desarrollo observamos diferencias (fig.3). Como bien afirman Berthet y colaboradores, la causa principal de la muerte son problemas cardíacos. Teniendo en cuenta que estos autores fechan la muerte de sus embriones a E15.5, posiblemente la disminución de niveles de reguladores de ciclo en sus análisis a día E16.5 sea más bien consecuencia de que los embriones están muriendo por fallo cardíaco.

Poco después de la publicación de este artículo, Berthet y Kaldis realizaron una revisión sobre el mismo (Berthet y Kaldis 2006). En su análisis afirman que Cdk2 y Cdk4 son necesarios para permitir la expresión de Cdk1 y que tan sólo durante los primeros estadios del desarrollo, la actividad Cdk2-Cdk4 no es imprescindible. Los resultados de Barrière y colaboradores demuestran que Cdk2 y Cdk4 no son esenciales en la mayor parte de los casos hasta las últimas fases del desarrollo, encontrándose incluso individuos que llegan a nacer. El análisis histológico de estos embriones sólo muestra afección en los cardiomiocitos y este hecho puede ser suficiente para causar la muerte del animal. Todo ello haría innecesario la coexistencia de dos tipos de ciclos celulares, uno que se prolongue hasta día E14.5 y otro que complete el desarrollo del embrión. No obstante, para comprobar que Cdk2 y Cdk4 no son necesarios durante el desarrollo salvo en este tipo celular especializado, sería necesario expresar en los cardiomiocitos de estos animales Cdk2 y Cdk4 manteniendo su ausencia en el resto de tejidos. No obstante, nuestro laboratorio ha demostrado esta hipótesis en animales adultos. La eliminación eficiente de un alelo condicional de Cdk2 en un animal Cdk4<sup>-/-</sup> no causó anomalías en los tejidos analizados y más relevantemente, ensayos de proliferación *in vivo* como recuperación de masa hepática tras hepatectomía parcial o ensayos de cicatrización no mostraron diferencias significativas en proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4 (Barrière *et al.*, 2007)

Berthet y colaboradores muestran que los MEFs Cdk2<sup>-/-</sup> Cdk4<sup>-/-</sup> no son capaces de immortalizarse y que tras varios pases, éstas células muestran una reducción progresiva de factores E2F dejando de proliferar totalmente aproximadamente a pase 10. Nuestros resultados sugieren que si bien durante los primeros pases los MEFs DKOs proliferan con menor intensidad, son capaces de immortalizarse y en esa situación, proliferar de forma similar a los MEFs silvestres (fig.1A y 1B). Berthet y colaboradores concluyen que Cdk2 y Cdk4 son imprescindibles para acoplar la transición G1/S con la mitosis. Nuestros experimentos muestran que si bien la entrada en fase S en MEFs primarios se produce con algo de retraso en ausencia de Cdk2 y Cdk4, con MEFs inmortales estas diferencias prácticamente desaparecen (fig.1C). No solo esto, sino que la cinética de expresión tanto de Cdk1 como de otros factores E2F como Ciclina A son prácticamente idénticos a sus controles silvestres. Todo ello acredita que Cdk2 y Cdk4 no son esenciales para la transición G1/S ni para regular la expresión de factores E2F y así acoplar interfase con mitosis.



### 3. Ciclo celular en ausencia de las tres Cdks de interfase, Cdk4, Cdk6 y Cdk2.

Los resultados obtenidos con el modelo  $Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-}$  en el que Cdk6 parecía sustituir al menos parcialmente a Cdk4 hacían pensar que a falta de Cdk4 y Cdk2, Cdk6 sería imprescindible para permitir el avance por G1. La generación de un modelo triple Knock out para las tres quinasas de interfase,  $Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-} Cdk6^{-/-}$  validaría o descartaría la posibilidad de que la sencillez del ciclo celular de un eucariota unicelular como es la levadura pudiera satisfacer los requerimientos de un organismo tan complejo como un mamífero. Los Drs. David Santamaría y Cédric Barrière generaron en nuestro laboratorio este modelo TKO.

Los animales TKO alcanzan el día E15.5 con proporciones mendelianas hasta E12.5 (Santamaría *et al.*, 2007). Estos embriones mueren principalmente debido a graves defectos hematopoyéticos, si bien se encuentran presentes los mismos defectos cardiacos que en los  $Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-}$  (Santamaría *et al.*, 2007). El análisis bioquímico de embriones E12.5 no mostraba alteración en los principales reguladores de ciclo analizados con la excepción de  $p27^{kip1}$  (fig. 3A). Esta desregulación se produce a nivel postraduccional. Es posible que la ausencia de los complejos que tradicionalmente unen a  $p27^{kip1}$  como Cdk4/6-CiclinaD y Cdk2-CiclinaE/A reduzca la estabilidad de esta proteína. Tampoco podemos descartar que el organismo reaccione ante la escasa actividad quinasa presente en ausencia de las tres quinasas de interfase, activando algún mecanismo de degradación de  $p27^{kip1}$  que pueda aliviar esta escasez de actividad Cdk.

Al igual que en los embriones  $Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-}$ , Rb se encuentra hipofosforilado mientras que los residuos Ser608, Ser780, Ser807/811 (fig.4A) si bien en este caso muestran una menor fosforilación que los embriones silvestres y  $Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-}$ , se encuentran fosforilados. Lo cual confirma que tan solo con que se encuentren fosforilados alguno de los residuos fosforilables de Rb puede ser suficiente para inactivarlo, al menos parcialmente y que el ciclo pueda progresar. La cuestión ahora es quién está fosforilando a Rb en ausencia de las quinasas de interfase. La respuesta es Cdk1. Encontramos a Cdk1 uniendo a las Ciclinas de G1 y S, Ciclina D y Ciclina E (fig.4B) más importantemente, encontramos actividad quinasa asociada a Ciclina D y E en extractos de embriones TKO (fig.4C). La unión de Cdk1 a las Ciclinas de G1 y S no es anecdótica como señalan nuestros resultados. En cuanto eliminamos la Cdk con mayor afinidad por la Ciclina de G1 y S, Cdk1 pasa a sustituir a esa Cdk (fig. 4B). De este modo observamos que siempre que Cdk4 no está presente, Cdk1 une a CiclinaD1 y CiclinaD2. Del mismo modo, siempre que Cdk2 no está presente, Cdk1 une a Ciclina E1. Esto indica que Cdk1 mantiene la capacidad presente en levaduras para unir a todas las Ciclinas y por ello poder desarrollar como mínimo un papel “comodín” en la interfase del ciclo celular de mamíferos.

La menor proliferación *in vitro* (fig.5A) es rescatada al transducir las células TKO con el oligopéptido T121 que inactiva Rb (fig.2C). Esto nos hace pensar que Cdk1 es capaz de realizar con eficiencia el resto de funciones celulares al margen de la inactivación de Rb y que las Cdks de interfase solamente potencian la inactivación de este oncosupresor. Más llamativo es el resultado

que obtenemos al transducir nuestras células con un shRNA cuya diana es la proteína p53. El rescate en la proliferación es comparable al que produce la inactivación de Rb (fig.5D) . En el mismo experimento comprobamos que ese efecto no es causado vía p21<sup>Cip1</sup> puesto que un shRNA contra esta proteína apenas rescata la proliferación. Este resultado sugeriría que de algún modo hasta ahora no descrito, p53 impide la desactivación de Rb o es capaz de frenar la desactivación de esta, por ejemplo impidiendo la transcripción de E2Fs o dianas de estos. Es un resultado llamativo.

Sorprende que las células sin Cdks de interfase puedan salir de quiescencia aun siendo con una cinética reducida (fig.6A y 6B). En contra de lo descrito por Berthet y colaboradores (Berthet *et al.*, 2006), hay inducción de Cdk1 y de factores E2F no solo en ausencia de Cdk2 y Cdk4, sino en ausencia de las tres quinasas de interfase (fig.6C). Además el complejo Cdk1-CiclinaD se establece desde las primeras horas tras estimular con suero la salida de quiescencia (fig.6D). Este complejo podría ser responsable de las fosforilaciones iniciales de Rb que permitirían la reentrada en ciclo. Curiosamente este complejo también se observa en los MEFs control a 24 y 28 horas tras la estimulación con suero. Probablemente ese momento coincida con la salida de mitosis, un momento en el que hay grandes cantidades de Cdk1 y sin embargo, sus Ciclinas canónicas están siendo activamente degradadas. Es posible que este complejo contribuya a la entrada en el siguiente ciclo mitótico.

Cdk1 es la quinasa encargada de conducir el ciclo celular en ausencia de las Cdks de interfase. Un shRNA contra Cdk1 imposibilitó la salida de quiescencia de las células TKO y eliminó la fosforilación de Rb (fig.7A y B). Además Cdk1 contribuye al desarrollo de todas las fases del ciclo en esta situación como lo atestigua que el perfil de ciclo quede congelado al transducir con un lentivirus que porta un shRNA contra Cdk1 (fig. 7C). No obstante, no se puede descartar totalmente una contribución de las Cdks no canónicas al ciclo. La evolución ha completado los genomas de los eucariotas conforme aumentaba su complejidad con un mayor número de loci codificantes para Cdks, llegando al menos a 11 (potencialmente 20) en el ratón . Cinco de ellas, Cdk1-Cdk4 y Cdk6 han sido las implicadas en la progresión del ciclo celular, pero no podemos descartar, que alguna de las Cdks menos estudiadas o que no han sido implicadas directamente en ciclo puedan desempeñar un rol en éste y sobre todo en una condición en la que hay escasa actividad quinasa. Se sabe de varias Cdks que aunque su función principal no está relacionada con el ciclo celular, pueden actuar en G1 y S . Cdk9, si bien se ha implicado principalmente en transcripción y diferenciación de tejidos (Wang y Fischer, 2008), está descrita su capacidad para fosforilar a Rb (De Luca *et al.*, 1997). Por otro lado, PCTAIRE1, es sustrato de Cdk5 y al igual que esta, se ha visto que está implicada en diferenciación neuronal principalmente (Cheng *et al.*, 2005). No obstante, su actividad es dependiente de ciclo celular y es máxima en S y G2 (Charrase *et al.*, 1999) . Igualmente, hay otras Cdks que se han implicado en G2 y M y que podrían estar contribuyendo a alcanzar el umbral de actividad quinasa requerido en estas y otras

fases. Nos referimos por ejemplo a Cdk10 cuya participación en G2/M ha sido descrita (Li *et al.* 1995) y a Cdk11 que se sabe actúa en Mitosis (Li *et al.*, 2004).

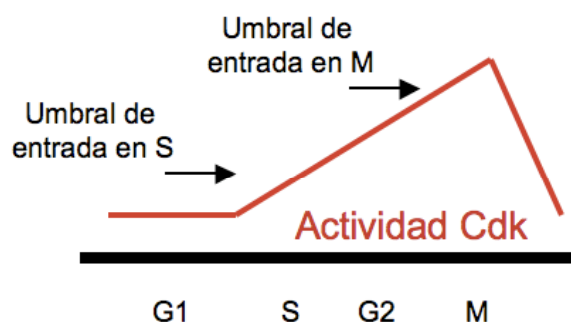
#### 4. Las Cdks de G1 y S son relevantes para G2

Si bien Cdk1 es capaz de impulsar el ciclo celular a través de todas sus fases, era previsible que G1 y S, las parte del ciclo donde están ausentes las Cdks que canónicamente se encargan de esas fases, fueran las etapas limitantes en la progresión celular de los MEFs TKO. Máxime cuando la desactivación de Rb mediada por T121 rescataba los niveles de proliferación (fig.5C). Para nuestra sorpresa, el perfil de FACs revela que las células se acumulan en G2 en lugar de en G1/S (fig.8A y B). Lo inmediato es pensar que la acumulación en G2 se debe a una deficiente desactivación de Rb que se materializa en un paso ralentizado a través de G2 debido a la ausencia de elementos transcritos por E2Fs necesarios para la progresión por esta fase. Sin embargo, la transducción con el oligopéptido T121 que inactiva a Rb y que sabemos rescata la proliferación (fig.5C) no consigue rescatar la acumulación en G2 (fig.8C). El análisis mediante micromatrices de expresión confirma que la expresión de las dianas de E2F en los MEFs TKO se encuentra reducida y que al transducir con T121 se recupera, pero sin darnos pistas de genes cuya expresión no sea capaz de recuperar el T121 (fig.10) y por tanto puedan ser responsables de la acumulación en G2. No obstante, podemos descartar que rutas relevantes como la de FoxM sean las causantes. Tampoco es responsable de esta fenotipo una hipotética activación de la respuesta a daño al ADN debido a baja actividad quinasa en torno a G1/S que podría provocar estrés replicativo (fig.9). Por tanto, no nos queda más que especular cuales pueden ser las posibles causas de esta acumulación en G2. La implicación de las Cdks de G1 y S en G2 podría ser de dos tipos:

**1. Sustratos específicos de quinasas de G1 y S en G2:** Es posible que las quinasas de G1 y S tengan sustratos que puedan ser más eficientemente fosforilados por estas Cdks que por Cdk1. Hay literatura que describe la participación de Cdk4 en G2 y en el mantenimiento de la fidelidad mitótica (Gabrielli *et al.*, 1999; Burgess *et al.*, 2006). Una vez inducida, Ciclina D se mantiene presente a lo largo de todo el ciclo celular, lo cual posibilita que estas quinasas puedan actuar durante todo el ciclo. En la salida de quiescencia veíamos que incluso en los MEFs control se producía una unión entre Cdk1 y Ciclina D en las últimas horas (fig.6D). Podríamos especular que la actividad procedente de Ciclina D sea también requerida en G2 y podemos pensar que Cdk4 pueda proporcionarla más eficientemente que Cdk1, que estará unida a la Ciclina A mayoritariamente. Otra posibilidad, es que las Cdks de interfase estén incidiendo sobre la actividad de Cdk1 al tener como sustrato a algunas de las proteínas implicadas en el control de la actividad de Cdk1 mediante la fosforilación/defosforilación de sus residuos Thr14 y Tyr15. De hecho, está descrito que Cdk2-Ciclina E es un regulador positivo de Cdc25 (Guadagno y Newport, 1996). No obstante, experimentos preliminares no nos han mostrado un aumento de la fosforilación inhibitoria de Cdk1 en los MEFs TKO. Finalmente, no es imprescindible que sea

requerida la actividad quinasa de las Cdks de interfase sino su presencia para titular las Ciclinas de S permitiendo a Cdk1 poder unirse tan solo a Ciclina A y más tarde a Ciclina B.

**2. Alta actividad quinasa requerida en la transición G2/M:** Sabemos desde los inicios de las investigaciones del ciclo celular que la actividad quinasa va creciendo conforme avanzan las fases del ciclo, siendo la máxima actividad requerida en la transición G2/M (fig.31). Es posible que Cdk1 sola no sea capaz de proveer con eficiencia toda la actividad quinasa necesaria para atravesar este umbral y que requiera el apoyo de las Cdks de G1 y S.



**Figura31. Nivel de actividad Cdk a lo largo del ciclo.** El ciclo celular requiere un nivel de actividad Cdk creciente, siendo necesario rebasar un umbral de entrada en S y un umbral de entrada en M. En Células de mamíferos Cdk1 es suficiente para cumplir con este modelo.

Lo que es un hecho en nuestros experimentos es que según eliminamos Cdks de G1 y S, los MEFs se acumulan progresivamente en G2 (fig.11) y teniendo en cuenta que esto no es un efecto dependiente de E2F como se ha descrito antes, sino de actividad quinasa, podemos concluir que sea porque tienen sustratos específicos o sea porque ayudan a alcanzar el elevado nivel de actividad quinasa requerido, las Cdks de G1/S son limitantes para atravesar G2, lo cual es inesperado.

### En mamíferos pueden coexistir varios ciclos celulares.

En los resultados descritos en esta tesis, hemos demostrado que el ciclo celular de mamíferos se puede producir en ausencia de todas las Cdks de interfase y que presumiblemente todos los acontecimientos necesarios para el progreso del ciclo celular pueden llevarse a cabo por una sola Cdk, Cdk1. Estas observaciones chocan con el modelo tradicional del ciclo celular de mamíferos en el que cada una de las fases es conducida por al menos una Cdk específica. En su lugar, parece que la división celular en mamíferos puede proceder de forma idéntica a la de organismos eucariotas unicelulares como las levaduras.

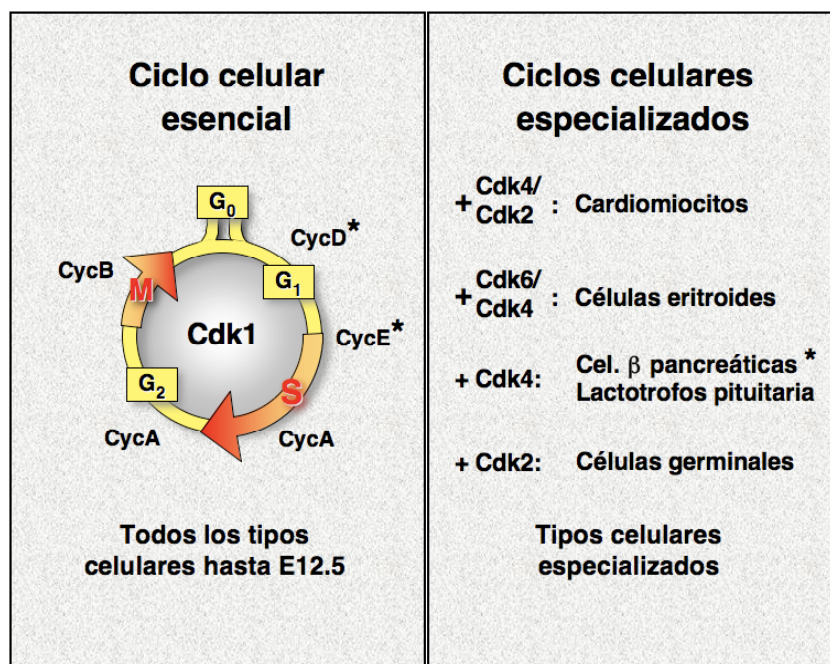
Mediante estudios bioquímicos y/o análisis de células proliferando *in vitro* se estableció un modelo en el que a diferencia de las levaduras, era necesario la participación de al menos una Cdk específica para asegurar que llegue a buen término la transición entre las fases del ciclo. Este modelo no tiene en cuenta que los organismos multicelulares pueden requerir niveles de control especiales para cada uno de los diferentes tipos celulares, por ejemplo para integrar de forma

diferente las señales mitogénicas o antimitogénicas, o simplemente, para modular el nivel global de actividad Cdk necesario para fosforilar proteínas clave (como por ejemplo las de la familia de Rb). Además, estas señales podrían tener que interpretarse en los diferentes tipos celulares de forma distinta, dependiendo de la fase de desarrollo en la que se encuentren. Por tanto, es probable que los organismos multicelulares hayan ampliado su repertorio de Cdks no sólo para asegurar el paso a través de las distintas fases del ciclo celular, como se pensaba hasta ahora, sino para satisfacer las necesidades específicas de cada tipo celular.

Las evidencias genéticas recabadas en los últimos años corroboran esta hipótesis. Por ejemplo, Cdk4 o Cdk6, son esenciales para la proliferación de los precursores hematopoyéticos. Su actividad no puede ser compensada ni por Cdk2 ni por Cdk1 (Malumbres *et al.*, 2004). Del mismo modo, los cardiomiocitos embrionarios requieren de Cdk4 o de Cdk2 para un desarrollo correcto y esta actividad no puede ser compensada por Cdk6 o por Cdk1 (Berthet *et al.* 2006; Barriere *et al.*, 2007). Estas observaciones no son exclusivas para el desarrollo embrionario. Por ejemplo, Cdk4 no es necesaria para que las células beta se dividan durante el desarrollo embrionario o en las primeras fases del desarrollo postnatal (Rane *et al.*, 1999) sin embargo, estas células sin Cdk4 dejan de proliferar en individuos adultos. Tampoco la eliminación en adultos de un alelo condicional de Cdk2 en un animal KO para Cdk4 conllevó ningún defecto adicional al producido por la ausencia de Cdk4 en ninguno de los tejidos (Barrière *et al.*, 2007). Todas estas observaciones en conjunto sugieren que tan solo determinados ciclos celulares de tipos celulares concretos durante el desarrollo requieren de alguna Cdk de interfase concreta.

En base a lo expuesto proponemos que el mecanismo esencial del ciclo celular se ha mantenido durante la evolución, desde la levadura hasta el mamífero. De acuerdo con este modelo, una sola Cdk, Cdk1 sería suficiente para proporcionar actividad quinasa uniéndose a los distintos tipos de Ciclinas, D, E, A y B. Las Cdks de interfase se asocian a sus Ciclinas promoviendo una fosforilación más eficiente de sustratos clave. Adicionalmente, podrían ser responsables de la fosforilación de sustratos específicos en linajes celulares concretos y/o durante periodos concretos del desarrollo (fig.32).

No obstante las conclusiones que presentamos y discutimos en esta tesis han sido obtenidas con modelos KO en los que se ha eliminado la expresión de Cdks. Como es sabido, las Cdks compiten por la unión de varias Ciclinas. Para ser capaces de evaluar rigurosamente hasta qué punto Cdk1 contribuye a la progresión por las fases G1 y S del ciclo en condiciones fisiológicas en las que se encuentran presentes las Cdks de interfase, sería necesario generar modelos animales en los que la expresión de las Cdks de interfase hayan sido sustituidas por versiones sin actividad quinasa, pero con la capacidad intacta de unir Ciclinas.



**Fig.32. Ciclos celulares presentes en mamíferos.** En el panel de la izquierda se muestra el ciclo celular esencial que es suficiente para la proliferación de la mayoría de los tipos celulares al menos hasta E12.5. Ciclina D y E ha sido demostrado que no son esenciales para la proliferación (Kozar *et al.*, 2004; Geng *et al.*, 2003). En el panel de la derecha se muestran las Cdks adicionales necesarias para el desarrollo de los ciclos celulares especializados presentes en determinados tipos celulares. En el caso de las células b pancreáticas sólo es requerida Cdk4 en organismos adultos.

## 6. Señalización de los Checkpoints en ausencia de las Cdks de interfase

Desde el momento en que una célula recibe el estímulo mitogénico suficiente y atraviesa el punto de restricción, el ciclo celular está avocado a completarse. Desde los primeros pasos en la investigación del ciclo celular, surgió interés por conocer si había mecanismos que fueran capaces de detener la progresión por el ciclo, bien porque la anterior fase no se hubiera completado, bien porque se hubieran detectado daños en el genoma. Así Leland H. Hartwell y Ted A. Weinert definen a finales de los años 80 los puntos de control o Checkpoints (Hartwell y Weinert, 1989). Poco más tarde se situaría a las Cdks como dianas claves en el proceso (Nurse, 2000). Por ello quisimos analizar si en ausencia de las Cdks de interfase los Checkpoints funcionaban de modo eficiente. Por ejemplo, al faltar las quinasas clave en el Checkpoint de G1/S, se podría teorizar que

la Cdk que las sustituye no fuese inhibida o por el contrario, que al haber baja actividad quinasa, se produjera una parada más eficiente en el ciclo celular.

Maude y Enders afirman en un artículo publicado en *Cancer Research* en 2005 que la inhibición de Cdk mediante Roscovitina u Olomucina, tenía claros efectos en la respuesta a daño al ADN. Según sus resultados, la inhibición de Cdk producía un descenso en el nivel de Chk1 y al mismo tiempo, la activación de la respuesta a daño al ADN como la ruta de ATM/Chk2, y la presencia de marcadores de daño como  $\gamma$ -H2AX. Por ello quisimos descartar que se produjera este fenotipo en nuestros MEFs sin quinasas de interfase antes de comenzar con nuestro análisis de los Checkpoints. Como se puede observar en la figura 9, no encontramos mayor intensidad de  $\gamma$ -H2AX ni activación de las rutas de ATR (Chk1) ni de ATM. Sin embargo, si encontramos disminución en los niveles totales de Chk1 (figura 15A). Por tanto podemos concluir que Cdk1 es suficiente para en ausencia de daño exógeno, mantener la homeostasis celular y evitar la generación de daño al ADN. Por otro lado, podemos aventurar que si bien como señalan Maude y Enders, el empleo de inhibidores de actividad Cdk en sentido amplio como Roscovitina y Olomucina podrían producir activación de respuesta a daño al ADN en tumores, el uso de inhibidores específicos de Cdk de interfase, no causarían estos efectos.

En los últimos años han surgido evidencias que amplían la participación de las Cdk en la respuesta frente a daño al ADN. Se ha visto por ejemplo que Cdk2 activa ATRIP fosforilándolo en Ser224 (Myers *et al.*, 2007). De este modo las Cdk además de ser diana del Checkpoint, podrían participar en su regulación. Por ello, analizamos el estado de la señalización del checkpoint. Como se puede ver en la figura 15A, tanto ATM como Chk1 se activan en respuesta a daño. No obstante, la intensidad de las bandas fosforiladas es claramente inferior a la de las células control. Parte de la señalización del daño al ADN, depende de que sea identificado. La identificación del daño se produce con mayor frecuencia cuanto más rápido se prolifere. Es decir, cuantas más veces por unidad de tiempo se pase por la transición G1/S y G2/M, con más frecuencia se detectará ese daño. Como demostramos en la figura 5A, las células TKO tienen un menor número de ciclos por unidad de tiempo. Para poder analizar la influencia real de las Cdk de interfase en la señalización del checkpoint se hacía necesario igualar la proliferación de los TKOs con respecto a las células control. Por ello empleamos los MEFs TKO transducidos con T121 que como demuestra la figura 5C, equipara la proliferación de los TKO con los MEFs control. En este escenario en el cual se despeja la variable de la proliferación (figura 5B) observamos que ATM y Chk1 recuperan notablemente el nivel de activación, a pesar de que en este último caso, el nivel de Chk1 total no se recupera absolutamente. Estos resultados sugieren que la implicación de las Cdk de interfase en la señalización de daño no es muy relevante.

El análisis funcional de los Checkpoints de G1/S y G2/M muestra que en ausencia de las Cdk de interfase, ambos son completamente eficientes (fig. 16A y 16B) o quizás ligeramente más eficientes que el de las células control. Satyanarayana y colaboradores muestran que en ausencia

de Cdk2, p21<sup>cip1</sup> inhibe a Cdk1, lo cual explicaría el funcionamiento del Checkpoint de G1/S en los TKOs. No podemos descartar que la ligeramente inferior señalización del daño que vemos (menores niveles de activación de las vías de ATM y ATR) en los TKOs si tuviera una relevancia funcional pero que esta se vea compensada por una parada de ciclo más eficiente al existir una menor actividad Cdk. En un escenario sin Cdks de interfase, la inhibición de la única Cdk de ciclo restante podría compensar posibles ineficiencias de señalización de daño.

## 7. Las Cdks de interfase son prescindibles para la reparación del ADN

Adicionalmente a la regulación del checkpoint, se ha visto que las Cdks regulan también a las proteínas de reparación BRCA1 y BRCA2 (Deans *et al* 2006; Esashi *et al* 2005) y más particularmente, regulan el proceso de resección del ADN que decide el sistema de reparación que usará la célula. Satyanarayana y colaboradores muestran que en ausencia de Cdk2, el Checkpoint de G1/S funciona de igual manera que en su presencia. Sin embargo, ven un defecto en la reentrada en ciclo, que asignan a una reparación ineficiente concluyendo que Cdk2 es importante para la reparación del ADN (Satyanarayana *et al.*, 2007). Estas evidencias hacían de interés analizar la implicación de las Cdks de interfase en la reparación del ADN mediante nuestras células TKO.

$\gamma$ -H2AX es un marcador establecido de la presencia de daño al ADN. Esta modificación de la histona H2A se extiende en las proximidades de la región de ADN dañado para reclutar a la maquinaria de señalización y reparación del ADN. La señal de  $\gamma$ -H2AX sólo desaparece cuando el ADN se ha reparado. Usando  $\gamma$ -H2AX como indicador de reparación observamos que la cinética tanto de formación de focos de  $\gamma$ -H2AX (señalización) como su desaparición (reparación) es muy similar en ambos casos (fig.17). Tan sólo se observa un nivel de activación de la señal de  $\gamma$ -H2AX ligeramente menor en los TKOs (fig.17A). Esta diferencia nuevamente es corregida cuando analizamos los MEFs TKOs transducidos con T121, lo cual significa que es debida a menor proliferación y no a la falta de las Cdks de interfase. Si bien el análisis de  $\gamma$ -H2AX indica que la reparación procede con normalidad, decidimos realizar un análisis funcional de la reparación, sometimos a daño continuado a nuestras células y observamos si se producía reducción en su capacidad proliferativa. Si las células tienen un sistema de reparación eficiente, no acumulan daño y por tanto son capaces de continuar proliferando de manera similar. Nuestros resultados (fig.18) muestran con claridad que las células TKO no detienen su crecimiento ante la multitud de agentes causantes de daño empleados, más que los MEFs control, atestiguando por tanto que el sistema de reparación es completamente funcional en ausencia de las Cdks de interfase.



## 8. Cdks y reparación mediante recombinación homóloga

Desde hace unos años se sabía que las Cdks estaban implicadas en la reparación por HR (Ira *et al.*, 2004) y que su actividad era imprescindible para que se produjera la reparación mediante este mecanismo (Jazayeri *et al.*, 2006). En 2007 se identificó la proteína CtIP como la diana de Cdk que permite el proceso de resección del DSB imprescindible para la reparación por HR (Sartori *et al.*, 2007). Nuestro análisis de la reparación de los MEFs TKO mostraba la inexistencia de defectos globales, pero esto podría deberse a que la reparación por NHEJ podría estar compensando a un HR ineficiente. La aparición de focos de RPA es un marcador inequívoco de que se ha producido resección del DSB. El análisis de la formación de focos de RPA en células TKO demuestra que en ausencia de las Cdks de interfase, el proceso de la resección del ADN se produce con igual eficacia (fig.19).

La reparación mediante HR es un proceso restringido a S tardío y G2, cuando se encuentra disponible una cromátida hermana que pueda usarse como molde. La Cdk que actúa en esa fase es principalmente Cdk1, lo cual la señalaría como principal candidato para dirigir el proceso de reparación por HR. En nuestros resultados vemos que el uso de un shRNA contra Cdk1 no tiene un efecto significativo en la formación de focos de RPA ni en la posterior activación de Chk1 (fig.20). Esto podría deberse a que su actividad fuese compensada por la otra Cdk que participa en S y G2: Cdk2. Sin embargo, el uso de un shRNA contra Cdk1 en células Cdk2<sup>-/-</sup> no reduce la presencia de focos de RPA. Posiblemente porque las Cdks de G1 y S estén llevando a cabo este proceso. El uso de un inhibidor de actividad Cdk inespecífico como es Roscovitina elimina la formación de focos, confirmando que sí es requerida actividad Cdk para que se produzca este proceso (fig.20). Podemos concluir por tanto que hay cierta flexibilidad en cuanto a la identidad de la Cdk que inicia la resección del ADN.

Nuestros resultados estarían sugiriendo que Cdks de G1 como son Cdk4 y Cdk6 son capaces de realizar un proceso restringido a S/G2. Con la generación del modelo TKO demostramos que la Cdk mitótica, Cdk1, puede actuar en interfase. Este resultado es una muestra de la compensación inversa, lo cual es un ejemplo de la flexibilidad que puede llegar a tener el ciclo celular. No obstante, se había definido a las Cdks como una herramienta para compartimentar los procesos de reparación a las fases de ciclo más adecuadas y sin embargo hemos visto que en las células en las que presumiblemente Cdk4 y Cdk6 están dirigiendo el proceso de HR, los focos de RPA se siguen formando únicamente en células que expresan Aurora B (Fig19 y X), es decir, que el proceso sigue restringido a G2 a pesar de faltar las quinasas de esta fase. Este resultado nos hace comprender que debe haber mecanismos adicionales que restrinjan la reparación mediante HR a la fase S/G2 del ciclo para impedir que este sistema de reparación pueda ser causa de inestabilidad genómica al inactivarse en un momento en el cual no hay cromátida homóloga. Alguno de los mecanismos adicionales que permiten que de una forma tan robusta la reparación por HR sólo proceda en S/G2 puede ser la regulación de la expresión de las proteínas necesarias

para que se produzca el proceso, como Chk1 o ATRIP que se sabe que están regulados por E2F. Así mismo, es posible que las dianas de las Cdks en este proceso como CtIP también que se encuentren reguladas por ciclo. Finalmente es posible que para que CtIP y otras posibles proteínas implicadas en HR sea fosforiladas por las Cdks éstas deban estar unidas a Ciclinas de S y G2. En tal caso deberíamos encontrar en nuestras células Cdk2<sup>-/-</sup> tratadas con shRNA de Cdk1, complejos Cdk4/6-CiclinaA.

La evidencia de que el tratamiento con Roscovitina reduce considerablemente la formación de focos de RPA (fig.29) demuestra que es requerida actividad Cdk para el proceso de reparación mediante HR. No obstante, no solo es requerida actividad Cdk en este proceso, sino que si aumentamos la intensidad de la actividad Cdk mediante el uso de MEFs p27<sup>-/-</sup> p21<sup>-/-</sup> obtenemos una respuesta más eficiente del checkpoint de G2/M (fig.30C) debido a que se forman más focos de RPA y se activa con mayor potencia Chk1 (fig.30B). Estos resultados muestran por tanto que es el nivel de actividad Cdk y no una Cdk en particular la que regula la reparación por recombinación homóloga.

## 9. Cdks y ciclo celular: Nuevos interrogantes

Si bien es cierto que esta tesis aporta nuevos datos que amplían nuestro conocimiento sobre el ciclo celular y sobre la participación de las Cdks en la respuesta frente al daño al ADN, también es cierto que despierta nuevas incógnitas, algunas de las cuales ya se han discutido y otras quedan por discutir.

La existencia de ciclos celulares que particularizan a determinados tipos celulares, hace previsible que el uso de inhibidores con especificidad por cada una de las Cdks pueda constituir una ventana terapéutica para tratar determinados tipos de tumores minimizando los efectos secundarios sobre otros tipos de tejidos.

En los resultados de esta tesis hemos demostrado que Cdk1 sustituye al resto de Cdks. Si bien en esta tesis se describe la compensación de la falta de actividad Cdk1 y Cdk2 por las quinasas de G1, nuestro grupo ha demostrado que Cdk1 es insustituible en términos de proliferación (Santamaria *et al.*, 2007). ¿Por qué ninguna otra Cdk puede ejercer las funciones de Cdk1? De todas las quinasas existentes en nuestro genoma, Cdk2 es la que posee mayor grado de identidad con Cdk1, siendo esta del 66% (Elledge *et al.*, 1992). Ambas quinasas son capaces de unir a todas las Ciclinas (Hochegger *et al.*, 2008) y sin embargo, el knock out de Cdk2 es viable y el cigoto knock out de Cdk1 no pasa de las primeras divisiones. Recientemente el grupo de Philip Kaldis ha mostrado que la sustitución del locus de Cdk1 por el ADNc de Cdk2 no rescata la letalidad embrionaria mostrada por el Knock out de Cdk1 (Satyanarayana *et al.*, 2008). Esto demuestra que no es por cuestiones de regulación de la expresión génica por lo que Cdk2 no puede compensar a Cdk1. Por tanto tenemos que pensar que se debe a modificaciones postraduccionales. Cdk2 mantiene su expresión invariablemente a lo largo del ciclo, así que sólo puede ser por una

cuestión de actividad. Posiblemente el nivel de actividad quinasa requerido durante la mitosis no pueda ser proporcionado por Cdk2. Las Cdks regulan su actividad principalmente por la unión a la Ciclina, por fosforilaciones activadoras o inhibidoras y por su unión a proteínas inhibidoras. Es posible que el grado de activación que le proporciona a Cdk2 la unión de Ciclina B sea insuficiente o que su especificidad varíe ligeramente. También es posible que los inhibidores de la familia CIP/KIP o los reguladores de su actividad mediante fosforilación, Wee1 y Myt, posean mayor afinidad por Cdk2 que por Cdk1 reduciendo su actividad. Sea cual fuere el motivo, lo que demuestra esta incapacidad de las quinasas de interfase para sustituir a la quinasa mitótica es que la mitosis es un proceso cuyo control debe ser muy estricto. Una mitosis en interfase podría ser devastadora para la supervivencia celular. Al mismo tiempo, parece mucho más sencillo controlar la actividad de una sola quinasa durante la mitosis para poder controlar con rapidez los súbitos cambios que son necesarios durante esta fase.

Nuestros resultados flexibilizan el modelo del ciclo celular, pero ¿Cuanto más flexible es? Desde hace tiempo se sabía que era necesaria actividad Cdk para el inicio de la replicación. El año pasado, los grupos de John Diffley (Zegerman y Diffley, 2007) y Hiroyuki Araki (Tanaka *et al.*, 2007) han demostrado que es necesaria la fosforilación por Cdk de Sld3 en levaduras para que se inicie la replicación. En mamíferos se presuponía que esa actividad era originada por Cdk2 y desde hace un tiempo también se sabe que esta actividad puede ser proporcionada por Cdk1, pero ¿podrían Cdk4 y Cdk6 llevar a cabo este proceso? Partiendo de quiescencia ¿Qué estadio del ciclo celular sería capaz de alcanzar una sola Cdk de interfase? ¿Son las Cdks imprescindibles tan sólo para inactivar a Rb?



# Conclusiones



Las conclusiones más relevantes de esta tesis son las siguientes:

1. Las Cdks de G1 y S, Cdk4, Cdk6 y Cdk2, cumplen un papel relevante en el desarrollo de la fase G2 del ciclo celular. Su eliminación acumula las células en G2 en lugar de en G1/S.
2. Las Cdks de interfase, son prescindibles para el desarrollo del ciclo celular en mamíferos. En su ausencia las células son capaces de proliferar, salir de quiescencia e immortalizarse.
3. En ausencia de las Cdks de interfase, Cdk1 se une a las Ciclinas de interfase, encontrándose actividad quinasa asociada a ellas. Tan pronto como una Cdk de interfase falta, Cdk1 se une a su Ciclina.
4. Sólo Cdk1 es imprescindible y suficiente para conducir el ciclo celular de mamíferos.
5. Las Cdks de interfase son prescindibles para la acción de los checkpoints y la reparación del ADN
6. Las Cdks de G1 y S pueden conducir un proceso restringido a Stardío/G2: La reparación mediante recombinación homóloga.
7. Un mayor nivel de actividad Cdk potencia la reparación por recombinación homóloga y la funcionalidad del checkpoint de G2/M





# **Bibliografía**



- Ball KL, Lain S, Fahraeus R, Smythe C, Lane DP.  
Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1.  
*Curr Biol.* 1997 Jan 1;7(1):71-80.
- Barrière C, Santamaría D; Cerqueira A, Galán J, Martín A, Ortega S, Malumbres M, Dubus P, Barbacid M.  
Mice thrive without Cdk4 and Cdk2.  
*Molecular Oncology.* 2007; 1:72-83.
- Beach D, Durkacz B, Nurse P.  
Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast.  
*Nature.* 1982 Dec 23;300(5894):706-9
- Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P.  
Cdk2 knockout mice are viable.  
*Curr Biol.* 2003; 13:1775-1785.
- Berthet C, Kaldis P.  
Cdk2 and Cdk4 cooperatively control the expression of Cdc2  
*Cell Div.* 2006 Jun 6;1:10.
- Berthet C, Klarmann KD, HiltonMB, Suh HC, Keller JR, Kiyokawa H, Kaldis P.  
Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation.  
*Develp. Cell.* 2006; 10:563-573.
- Bell SP, Dutta A.  
DNA replication in eukaryotic cells.  
*Annu Rev Biochem.* 2002;71:333-74. Epub 2001 Nov 9. Review.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y.  
GammaH2AX and cancer.  
*Nat Rev Cancer.* 2008 Dec;8(12):957-67.
- Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T.  
Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4344-9.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.  
Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.  
*Nature.* 1998 Feb 5;391(6667):597-601.
- Burgess A, Wigan M, Giles N, Depinto W, Gillespie P, Stevens F, Gabrielli B.  
Inhibition of S/G2 phase CDK4 reduces mitotic fidelity.  
*J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):9987-95
- Charrasse S, Carena I, Hagmann J, Woods-Cook K, Ferrari S.  
PCTAIRE-1: characterization, subcellular distribution, and cell cycle-dependent kinase activity.  
*Cell Growth Differ.* 1999 Sep;10(9):611-20
- Cheng K, Li Z, Fu WY, Wang JH, Fu AK, Ip NY  
Pctaire1 interacts with p35 and is a novel substrate for Cdk5/p35.  
*J Biol Chem.* 2002 Aug 30;277(35):31988-93. Epub 2002 Jun 25.

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 Aug 15;10(16):1979-90

De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH.  
Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.  
*Nature*. 1993 Jun 17;363(6430):595-602.

DeGregori J, Leone G, Ohtani K, Miron A, Nevins JR.  
E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1  
cyclin-dependent kinase activity.  
*Genes Dev*. 1995 Dec 1;9(23):2873-87.

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 Aug;15(8):4215-24.

De Luca A, Esposito V, Baldi A, Claudio PP, Fu Y, Caputi M, Pisano MM, Baldi F, Giordano A.  
CDC2-related kinase PITALRE phosphorylates pRb exclusively on serine and is widely expressed  
in human tissues.  
*J Cell Physiol*. 1997 Aug;172(2):265-73

Desai D, Wessling HC, Fisher RP, Morgan DO.  
Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2.  
*Mol Cell Biol*. 1995 Jan;15(1):345-50.

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 Jul 17;50(2):319-25.

Driscoll B, T'Ang A, Hu YH, Yan CL, Fu Y, Luo Y, Wu KJ, Wen S, Shi XH, Barsky L, Weinberg  
K, Murphree AL, Fung YK.  
Discovery of a regulatory motif that controls the exposure of specific upstream cyclin-dependent  
kinase sites that determine both conformation and growth suppressing activity of pRb.  
*J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9463-71.

Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ,  
Reed SI.  
p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human  
fibroblasts during radiation-induced G1 arrest.  
*Cell*. 1994 Mar 25;76(6):1013-23.

Dulic V, Lees E, Reed SI.  
Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase.  
*Science*. 1992 Sep 25;257(5078):1958-61.

- Dyson N.  
The regulation of E2F by pRB-family proteins.  
Genes Dev. 1998 Aug 1;12(15):2245-62. Review.
- Elledge SJ, Spottswood MR.  
A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a *cdc28* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Egl.  
EMBO J. 1991 Sep;10(9):2653-9.
- 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 May 7;73(3):487-97.
- 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.
- Fisher RP, Morgan DO.  
A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase.  
Cell. 1994 Aug 26;78(4):713-24
- Fisher RP.  
Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription.  
J Cell Sci. 2005 Nov 15;118(Pt 22):5171-80. Review.
- Fotedar R, Fitzgerald P, Rousselle T, Cannella D, Doree M, Messier H, Fotedar A.  
p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity.  
Oncogene. 1996 May 16;12(10):2155-64.
- Gabrielli BG, Sarcevic B, Sinnamon J, Walker G, Castellano M, Wang XQ, Ellem KA.  
A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay.  
J Biol Chem. 1999 May 14;274(20):13961-9
- Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J.  
Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*.  
Cell. 1988 Jul 29;54(3):433-9.
- 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 Aug 22;114(4):431-43.
- 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 Dec 20;67(6):1169-79.

Graña X, De Luca A, Sang N, Fu Y, Claudio PP, Rosenblatt J, Morgan DO, Giordano A.  
PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3834-8.

Graña X, Claudio PP, De Luca A, Sang N, Giordano A  
PISSLRE, a human novel CDC2-related protein kinase.

Oncogene. 1994 Jul;9(7):2097-103

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; 128:269-80

Guadagno TM, Newport JW.

Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity.

Cell 1996; 84:73-82.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T.

The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.

Science. 1988 Jul 1;241(4861):42-52. Review

Hanks SK.

Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(2):388-92.

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 Dec 28;276(52):48937-43.

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 Sep 17;98(6):859-69.

Harper JW, Burton JL, Solomon MJ.

The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more.

Genes Dev. 2002 Sep 1;16(17):2179-206. 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 Apr;6(4):387-400.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ.

The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.

Cell. 1993 Nov 19;75(4):805-16.

- Hartwell LH, Weinert TA  
Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.  
*Science*. 1989 Nov 3;246(4930):629-34. Review
- Hochegger H, Takeda S, Hunt T.  
Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?  
*Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Nov;9(11):910-6. Epub 2008 Sep 24.
- 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 May;4(5):358-66
- Huard JM, Forster CC, Carter ML, Sicinski P, Ross ME.  
Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2.  
*Development*. 1999; 126; 1927-1935.
- Izumi T, Walker DH, Maller JL.  
Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity.  
*Mol Biol Cell*. 1992 Aug;3(8):927-39.
- 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 Mar;7(3):331-42.
- 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 Dec;6(12):1229-35.
- Kaneko YS, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, Tominaga K, Terasawa M, Tachibana A, Ikeda K, Nakanishi M.  
Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase.  
*Oncogene*. 1999 Jun 24;18(25):3673-81.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW.  
How proteolysis drives the cell cycle.  
*Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1652-9. Review
- Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S, Taya Y.  
The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2.  
*EMBO J*. 1996 Dec 16;15(24):7060-9
- Knudsen ES, Wang JY  
Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation.  
*Mol Cell Biol*. 1997 Oct;17(10):5771-83.
- 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 Nov;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 Oct 5;294(5540):173-7. Epub 2001 Aug 30
- 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 Sep 18;257(5077):1689-94
- 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.
- 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 Apr 1;11(7):847-62
- Lacy ER, Filippov I, Lewis WS, Otieno S, Xiao L, Weiss S, Hengst L, Kriwacki RW.  
p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding.  
*Nat Struct Mol Biol.* 2004 Apr;11(4):358-64.
- 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
- Le Guellec R, Paris J, Couturier A, Roghi C, Philippe M.  
Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein.  
*Mol Cell Biol.* 1991 Jun;11(6):3395-8.
- Lee MG, Nurse P.  
Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*.  
*Nature*. 1987 May 7-13;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 Feb;13(2):1194-201
- Li S, MacLachlan TK, De Luca A, Claudio PP, Condorelli G, Giordano A.  
The *cdc-2*-related kinase, PISSLRE, is essential for cell growth and acts in G2 phase of the cell cycle.  
*Cancer Res.* 1995 Sep 15;55(18):3992-5.



- Li T, Inoue A, Lahti JM, Kidd VJ.  
Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11(p110/p58)-null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development.  
Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(8):3188-97
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ.  
Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse.  
Nat Genet. 1998 Dec;20(4):377-80.
- Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnica-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 Feb;17(2):571-83.
- Liu J, Kipreos ET  
Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa.  
Mol Biol Evol. 2000 Jul;17(7):1061-74.
- Malumbres M, Barbacid M.  
To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.  
Nat Rev Cancer. 2001 Dec;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, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M.  
Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6.  
Cell. 2004 Aug 20;118(4):493-504.
- Malumbres M, Carnero A.  
Cell cycle deregulation: a common motif in cancer.  
Prog Cell Cycle Res. 2003;5:5-18. Review.
- Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ.  
Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34<sup>PSK</sup>-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins.  
Cell. 1992 Oct 16;71(2):323-34.
- 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 Aug;11(8):2909-17.
- Meyerson M, Harlow E.  
Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner.  
Mol Cell Biol. 1994 Mar;14(3):2077-86
- Mineo C, Murakami Y, Ishimi Y, Hanaoka F, Yamada M.  
Isolation and analysis of a mammalian temperature-sensitive mutant defective in G2 functions.  
Exp Cell Res. 1986 Nov;167(1):53-62.

- Moreno S, Hayles J, Nurse P.  
Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis.  
*Cell*. 1989 Jul 28;58(2):361-72.
- Morgan DO.  
Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.  
*Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261-91. Review.
- Morgan DO.  
The dynamics of cyclin dependent kinase structure.  
*Curr Opin Cell Biol*. 1996 Dec;8(6):767-72. Review
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG.  
Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase.  
*Mol Biol Cell*. 1995 Jan;6(1):119-34.
- Myers JS, Zhao R, Xu X, Ham AJ, Cortez D.  
Cyclin-dependent kinase 2 dependent phosphorylation of ATRIP regulates the G2-M checkpoint response to DNA damage.  
*Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6685-90.
- Nasmyth KA, Reed SI.  
Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Apr;77(4):2119-23
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI.  
Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis.  
*Dev Cell*. 2004 May;6(5):661-72.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S.  
Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication.  
*EMBO J*. 2000 May 2;19(9):2069-81.
- Nakayama K, Nakayama K.  
Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development.  
*Bioessays*. 1998 Dec;20(12):1020-9. Review.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K.  
Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors.  
*Cell*. 1996 May 31;85(5):707-20.
- Nakayama KI, Hatakeyama S, Nakayama K.  
Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1.  
*Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Apr 13;282(4):853-60. Review.

- 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 budding yeast *cdc28* mutation.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 15;88(20):9006-10.
- Nurse P.  
A long twentieth century of the cell cycle and beyond.  
Cell. 2000 Jan 7;100(1):71-8. Review. No abstract available.
- Nurse P, Bissett Y.  
Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast.  
Nature. 1981 Aug 6;292(5823):558-60.
- Ohi R, Gould KL.  
Regulating the onset of mitosis.  
Curr Opin Cell Biol. 1999 Apr;11(2):267-73. 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.
- 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.
- Pines J, Hunter T.  
Cyclins A and B1 in the human cell cycle.  
Ciba Found Symp. 1992;170:187-96; discussion 196-204. Review
- Pardee AB.  
G1 events and regulation of cell proliferation.  
Science. 1989 Nov 3;246(4930):603-8. Review.
- Pavletich NP.  
Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors.  
J Mol Biol. 1999 Apr 16;287(5):821-8. Review.
- Pines J, Hunt T.  
Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs.  
EMBO J. 1987 Oct;6(10):2987-95.
- 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
- Reed SI, Hadwiger JA, Lőrincz AT.  
Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jun;82(12):4055-9
- Riabowol K, Draetta G, Brizuela L, Vandre D, Beach D.  
The *cdc2* kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. Cell (1989) vol. 57 (3) pp. 393-401

- Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M.  
A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci.  
Mol Cell. 2004 Dec 3;16(5):715-24
- Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, Dynlacht BD.  
E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints.  
Genes Dev. 2002 Jan 15;16(2):245-56.
- Russell P, Nurse P.  
Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided.  
Cell. 1986 Jun 20;45(6):781-2
- Sáenz Robles MT, Symonds H, Chen J, Van Dyke T.  
Induction versus progression of brain tumor development: differential functions for the pRB- and p53-targeting domains of simian virus 40 T antigen.  
Mol Cell Biol. 1994 Apr;14(4):2686-98.
- Satyanarayana A, Berthet C, Lopez-Molina J, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P.  
Genetic substitution of Cdk1 by Cdk2 leads to embryonic lethality and loss of meiotic function of Cdk2.  
Development. 2008 Oct;135(20):3389-400. Epub 2008 Sep 11.
- Santamaría D, Ortega S.  
Cyclins and Cdks in development and cancer: lessons form genetically modified mice.  
Frontiers in Bioscience. 2006; 11:1164-1188
- Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM.  
Histone H2AX in DNA damage and repair.  
Cancer Biol Ther. 2003 May-Jun;2(3):233-5
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE.  
Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1.  
Genes Dev. 1997 Jun 1;11(11):1464-78.
- Sherr CJ, Roberts JM.  
Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.  
Genes Dev. 2004 Nov 15;18(22):2699-711. Review.
- Sherr CJ.  
The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited.  
Cancer Res. 2000 Jul 15;60(14):3689-95. Review.
- Sherr CJ, Roberts JM.  
CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.  
Genes Dev. 1999 Jun 15;13(12):1501-12. Review.
- Sherr CJ.  
Cancer cell cycles.  
Science. 1996 Dec 6;274(5293):1672-7. Review.
- Sherr CJ, Roberts JM.  
Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.  
Genes Dev. 1995 May 15;9(10):1149-63. Review.

- Sherr CJ.  
G1 phase progression: cycling on cue.  
Cell. 1994 Nov 18;79(4):551-5. 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.
- Simanis V, Nurse P.  
The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation.  
Cell. 1986 Apr 25;45(2):261-8
- 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 Sep 15;13(18):2375-87
- 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.
- 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 Feb;7(2):135-46.
- 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 May 15;14(19):2251-7.
- Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW.  
Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation.  
Front Biosci. 2000 Jan 1;5:D121-37.
- Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H.  
CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast.  
Nature. 2007 Jan 18;445(7125):328-32. Epub 2006 Dec 13
- Tassan JP, Jaquenoud M, Léopold P, Schultz SJ, Nigg EA  
Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8871-5.

Th'ng JP, Wright PS, Hamaguchi J, Lee MG, Norbury CJ, Nurse P, Bradbury EM.  
The FT210 cell line is a mouse G2 phase mutant with a temperature-sensitive CDC2 gene product.  
*Cell*. 1990 Oct 19;63(2):313-24.

Tsai LH, Harlow E, Meyerson M.  
Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase.  
*Nature*. 1991 Sep 12;353(6340):174-7. 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, Harlow E.  
Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control.  
*Science*. 1993 Dec 24;262(5142):2050-4

Vlach J, Hennecke S, Amati B.  
Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.  
*EMBO J*. 1997 Sep 1;16(17):5334-44.

Wang S, Fischer PM.  
Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology.  
*Trends Pharmacol Sci*. 2008 Jun;29(6):302-13. Epub 2008 Apr 16. Review

Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD.  
Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation.  
*Cell*. 1999 Apr 2;97(1):99-109.

Wood JL, Chen J.  
DNA-damage checkpoints: location, location, location.  
*Trends Cell Biol*. 2008 Oct;18(10):451-5. Epub 2008 Aug 2

Xiang J, Lahti JM, Grenet J, Easton J, Kidd VJ.  
Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms.  
*J Biol Chem*. 1994 Jun 3;269(22):15786-94.

Zarkowska T, Mittnacht S.  
Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases.  
*J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12738-46

Zegerman P, Diffley JF.  
Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast.  
*Nature*. 2007 Jan 18;445(7125):281-5. Epub 2006 Dec 13

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 Mar 31;101(1):79-89

Zierhut C, Diffley JF

Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response.  
EMBO J. 2008 Jul 9;27(13):1875-85. Epub 2008 May 29.





# 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).

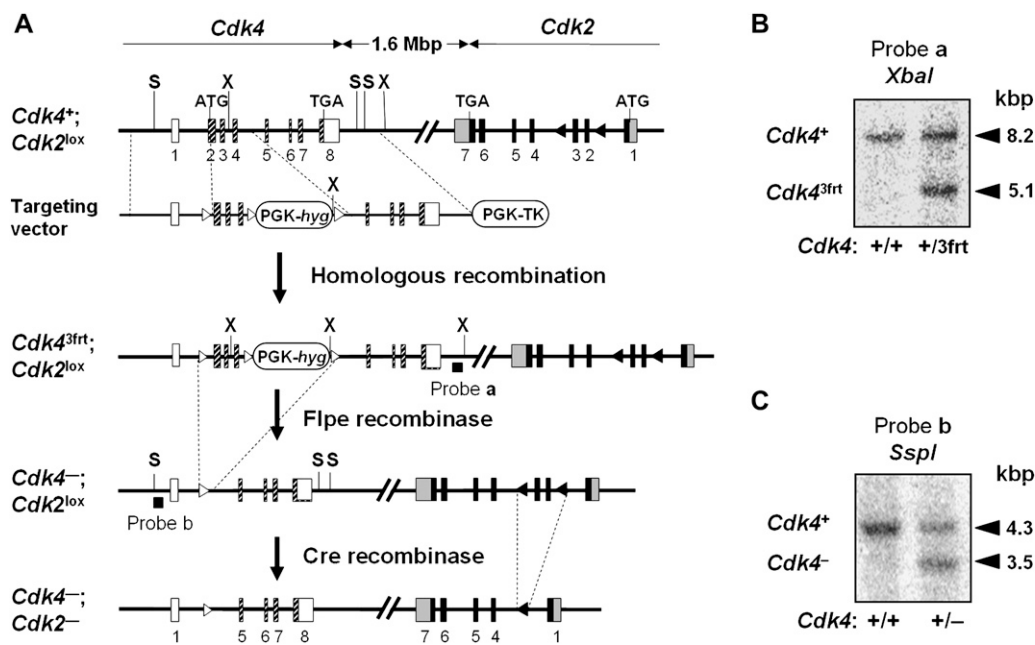
This model, mainly deduced from biochemical evidence, has not sustained genetic scrutiny. For instance, all mouse cell types, with the exception of pancreatic beta cells and pituitary lactotrophs proliferate normally in the absence of Cdk4 (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Likewise, ablation 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*<sup>lox</sup> allele (Figure 1). Intercrosses between  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/-}$  double heterozygous animals result in the generation of midgestation ( $E13.5$ )  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$

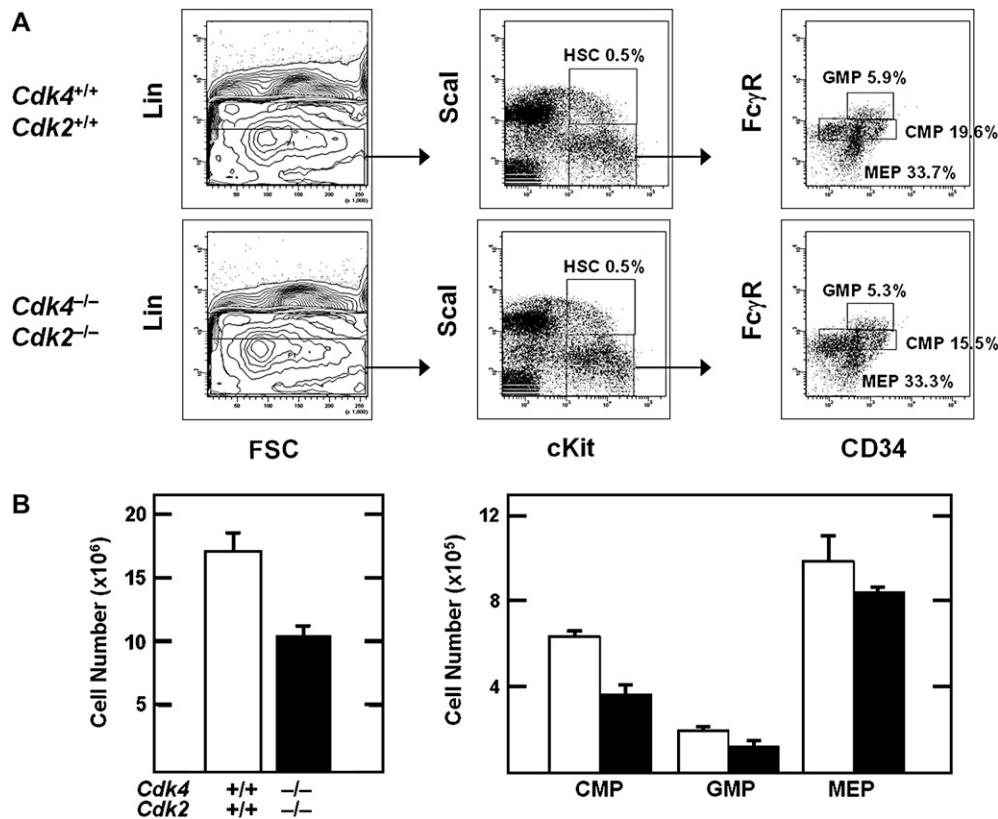


**Figure 1** – Generation of  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox}$  and  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  mice. (A) Targeting strategy. The targeting vector carries three *firt* sequences flanking exons 2 and 4 as well as a PGK-HygR cassette used for positive selection. The vector also contains a PGK-TK cassette used for negative selection. Recombinant ES cell clones containing a floxed *Cdk2*<sup>lox</sup> allele were used to generate mice carrying the *Cdk4*<sup>3firt</sup> and *Cdk2*<sup>lox</sup> 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*<sup>3firt</sup> recombinant allele. (C) Southern blot analysis to identify the *Cdk4*<sup>-</sup> null allele.

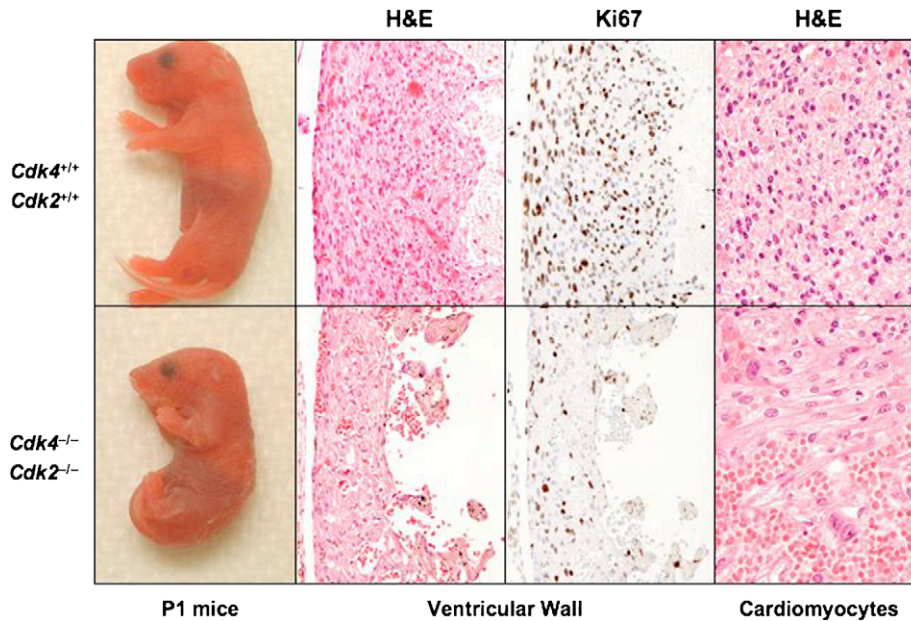
embryos with Mendelian ratios (41/165, 25%). More importantly, a significant percentage of these embryos (about 40%) complete embryonic development. Newborn  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  mice weigh 25–40% less than their wild type littermates, a reduction in weight slightly more pronounced than that reported 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,

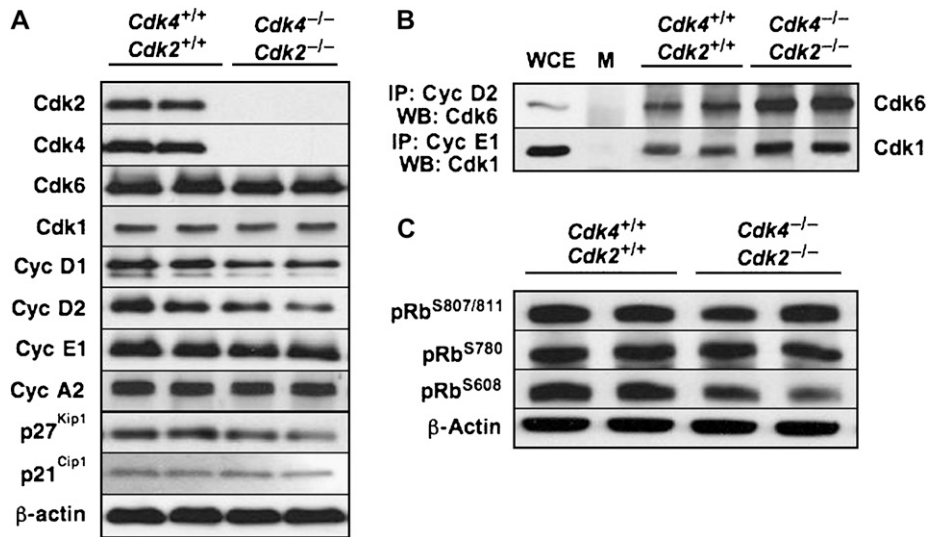


Figure 4 – Biochemical characterization of cell cycle regulators in embryos lacking Cdk4 and Cdk2. (A) Expression levels of cell cycle regulators in wild type (*Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup>) and mutant (*Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup>) E17.5 embryos. Protein extracts were analyzed 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.

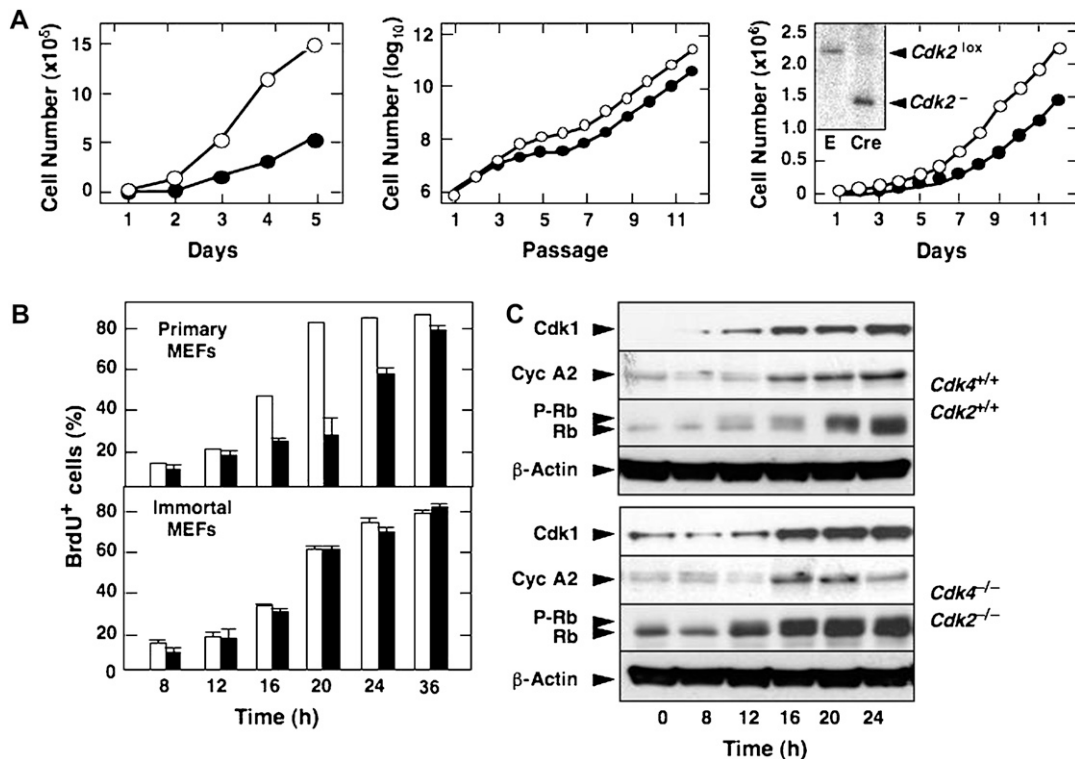


Figure 5 – Proliferative properties of primary and immortal MEFs. (A) Left panel shows proliferation of primary MEFs at passage 2. Center panel shows immortalization of primary MEFs by continuous passage following a classical 3T3 protocol. *Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup> (open circles) and *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  $\mu$ M 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.  $\beta$ -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).

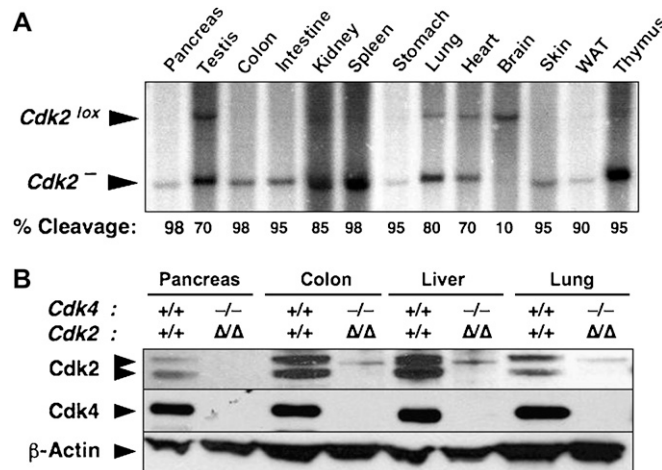
#### 2.4. Ablation of *Cdk4* and *Cdk2* in adult mice

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

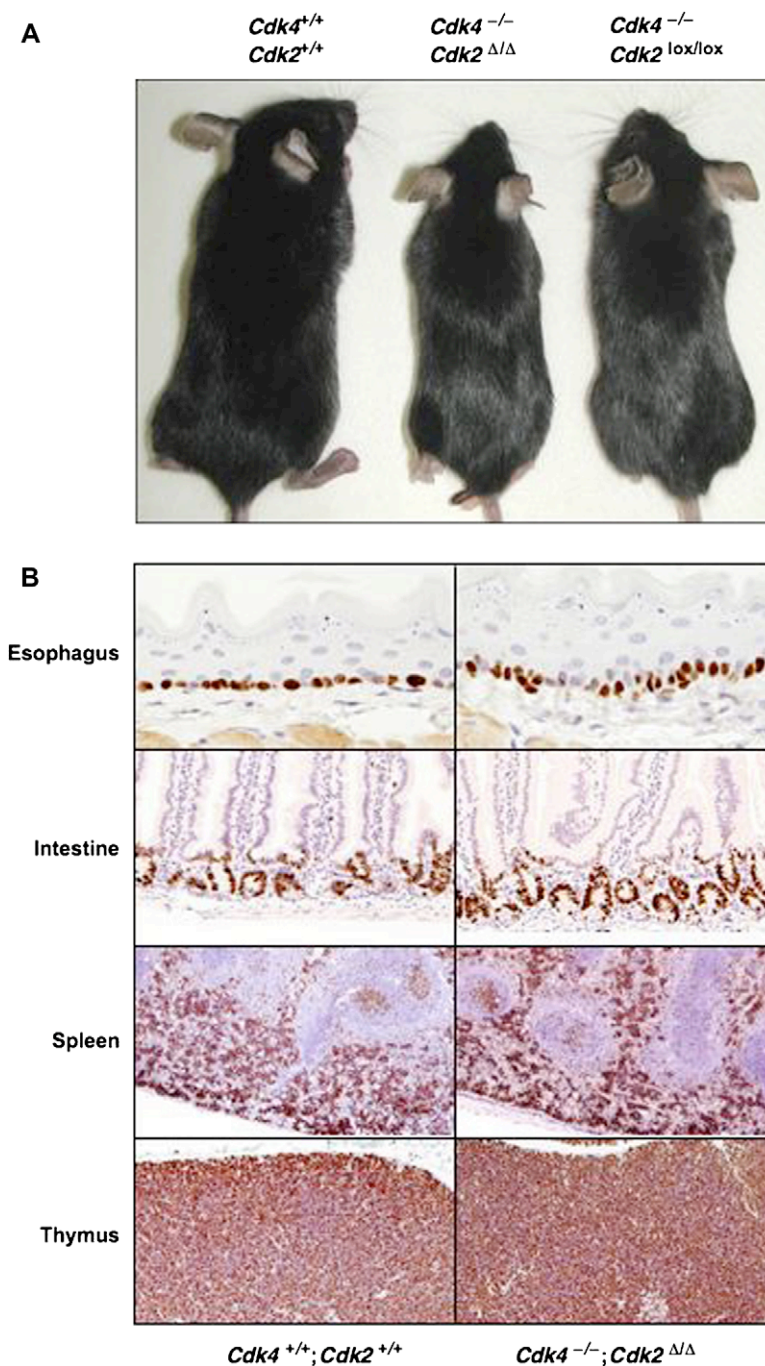
to a developmental defect in specific lineages such as cardiomyocytes by ablating the *Cdk2* locus in adult mice. To this end, we generated compound *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> animals (see Section 4) in which the *Cdk2*<sup>lox</sup> alleles can be knocked 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

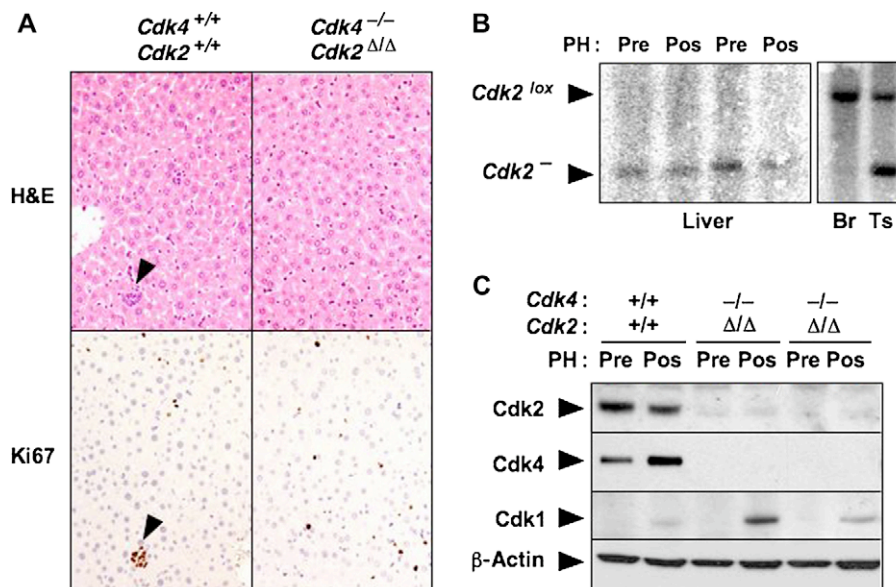
around 2.5% of the total body weight. Regenerated livers of 4-OHT-treated  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  and  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice ( $n = 3$ ) displayed similar overall appearance and size ( $2.70 \pm 0.14\%$  in the control mice and  $2.55 \pm 0.21\%$  in  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  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 cell 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.

# Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle

David Santamaría<sup>1\*</sup>, Cédric Barrière<sup>1,2\*†</sup>, Antonio Cerqueira<sup>1</sup>, Sarah Hunt<sup>1†</sup>, Claudine Tardy<sup>1</sup>, Kathryn Newton<sup>3</sup>, Javier F. Cáceres<sup>3</sup>, Pierre Dubus<sup>2</sup>, Marcos Malumbres<sup>1</sup> & Mariano Barbacid<sup>1</sup>

Unicellular organisms such as yeasts require a single cyclin-dependent kinase, Cdk1, to drive cell division<sup>1</sup>. In contrast, mammalian cells are thought to require the sequential activation of at least four different cyclin-dependent kinases, Cdk2, Cdk3, Cdk4 and Cdk6, to drive cells through interphase, as well as Cdk1 to proceed through mitosis<sup>2</sup>. This model has been challenged by recent genetic evidence that mice survive in the absence of individual interphase Cdks<sup>3–8</sup>. Moreover, most mouse cell types proliferate in the absence of two or even three interphase Cdks<sup>8–10</sup>. Similar results have been obtained on ablation of some of the activating subunits of Cdks, such as the D-type and E-type cyclins<sup>11–14</sup>. Here we show that mouse embryos lacking all interphase Cdks (Cdk2, Cdk3, Cdk4 and Cdk6) undergo organogenesis and develop to midgestation. In these embryos, Cdk1 binds to all cyclins, resulting in the phosphorylation of the retinoblastoma protein pRb and the expression of genes that are regulated by E2F transcription factors. Mouse embryonic fibroblasts derived from these embryos proliferate *in vitro*, albeit with an extended cell cycle due to inefficient inactivation of Rb proteins. However, they become immortal on continuous passage. We also report that embryos fail to develop to the morula and blastocyst stages in the absence of Cdk1. These results indicate that Cdk1 is the only essential cell cycle Cdk. Moreover, they show that in the absence of interphase Cdks, Cdk1 can execute all the events that are required to drive cell division.

When *Cdk4*<sup>+/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>+/-</sup> mice are crossed, 25% of the conceptuses should be triple knockout (TKO) *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup>, as *Cdk4* and *Cdk2* are genetically linked<sup>9,10</sup>. We obtained TKO embryos at the expected mendelian ratios from such crosses (Supplementary Table 1). These embryos underwent morphogenesis and organogenesis and developed until embryonic day 12.5 (E12.5) (Fig. 1a). Cells proliferated in most tissues, as measured by staining for the proliferative marker Ki67 (Fig. 1a, Supplementary Fig. 1a). However, TKO embryos were not normal and began to die at E13.5, with all dying by E15.5. The livers of live TKO embryos at E12.5–E13.5 showed a threefold reduction in cellularity, a decrease that is significantly higher than expected from their smaller size (25–40%). The levels of haematopoietic stem cells, granulocyte-macrophage progenitors and megakaryocyte-erythroid progenitors were consistent with the overall reduction in liver cellularity. Only common myeloid progenitors showed a greater (eightfold) reduction (Supplementary Fig. 1b). More importantly, livers from TKO embryos, unlike those from *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos, undergo substantial apoptosis at E13.5–E14.5, as determined by active caspase 3 immunoreactivity (Supplementary Fig. 1b). The hearts of TKO embryos showed thinner ventricular walls than those of wild-type controls owing to a decrease in the number of proliferating cardiomyocytes (data not shown). This phenotype was indistinguishable from that of *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup>

embryos, which could complete embryonic development<sup>10</sup>. Thus, although we cannot rule out the possibility that the heart phenotype contributed to embryonic death, the severity of the haematopoietic defects makes them more likely to account for the failure of TKO embryos to develop beyond midgestation.

The loss of interphase Cdks did not have a significant effect on the levels of expression of other cell-cycle regulators. The overall levels of Cdk1, Cdk7 and Cdk9 appeared to be unchanged (Fig. 1b). There were no significant variations in the expression of the cyclins tested (D1, D2, E1, A2 and B1). Among Cip/Kip inhibitors, only cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (*Cdkn1b*, also known as p27<sup>Kip1</sup>) showed decreased protein levels in TKO embryos (Fig. 1b), probably owing to increased protein instability, as the levels of *Cdkn1b* messenger RNA were not affected (Supplementary Fig. 2). pRb was phosphorylated in TKO embryos, including at those residues (Ser 608, Ser 780 and Ser 807/811) that were previously thought to be specific targets of interphase Cdks<sup>15</sup> (Fig. 1c).

To understand the molecular mechanisms that drive cell division in the absence of interphase Cdks, we investigated whether Cdk1 could interact with G1/S cyclins. As shown in Fig. 1d, Cdk1 interacts with cyclin D1 and cyclin D2 in lysates derived from embryos lacking Cdk4. Likewise, Cdk1 binds to cyclin E in *Cdk2*<sup>-/-</sup> and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos, as previously reported<sup>10,16</sup>. Moreover, cyclin D and E immunoprecipitates from TKO embryos could phosphorylate recombinant pRb (Fig. 1e), possibly owing to their ability to form complexes with Cdk1.

The proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in culture was partially compromised in the absence of interphase Cdks. However, most TKO MEF cultures (11 of 12) became immortal upon continuous passage (Supplementary Fig. 3a, b). These TKO MEFs, as well as control cultures that expressed at least one interphase Cdk, maintained the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*Cdkn2a*, also known as p16<sup>INK4a</sup>) and a functional P53 response (data not shown). Immortal TKO cultures, unlike those expressing at least one interphase Cdk, retained their extended doubling time. To understand the molecular basis of the slower cell cycle of TKO MEFs, we infected them with a retrovirus that expressed a fragment of the simian virus 40 (SV40) large T antigen (T<sub>121</sub>) that is known to inactivate the three members of the Rb family<sup>17</sup>. Inactivation of all pocket proteins made the proliferation rates of TKO MEFs indistinguishable from those of wild-type cells (Supplementary Fig. 3c). These observations indicate that the slower cell cycles of TKO MEFs are a consequence of incomplete inactivation of Rb proteins. We obtained similar results from TKO MEFs derived from immortal *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup> cells after infection with a retrovirus expressing the Cre recombinase (Supplementary Fig. 3d), ruling out the idea that the proliferation of TKO MEFs was a consequence of embryonic plasticity.

<sup>1</sup>Molecular Oncology Programme, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), E-28029 Madrid, Spain. <sup>2</sup>EA2406 University of Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France. <sup>3</sup>MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh EH4 2XU, UK. †Present addresses: Laboratoire de Morphogenèse et Signalisation Cellulaire, UMR 144/Institut Curie, 25 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France (C.B.); Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles, 08916 Badalona, Barcelona, Spain (S.H.).

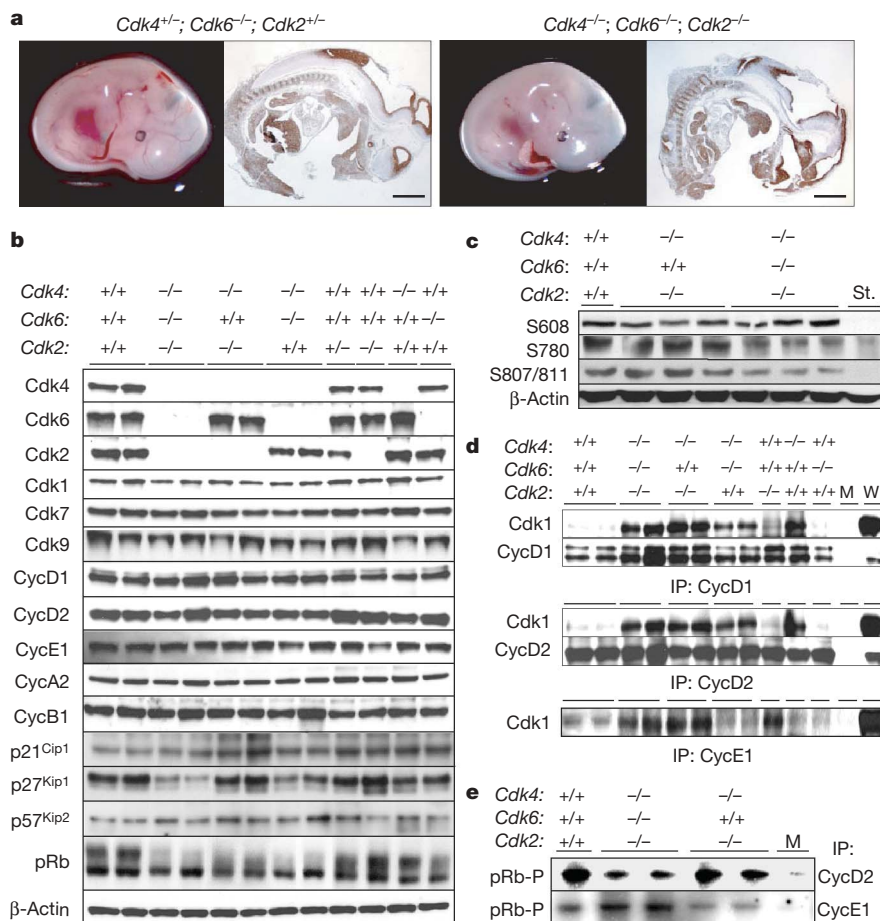
\*These authors contributed equally to this work.

TKO MEFs exited quiescence when stimulated with serum, albeit with significantly delayed (6–8 h) kinetics (Fig. 2a). However, most primary and immortal TKO MEFs entered the cell cycle (Fig. 2b) and executed the molecular steps that are known to be required to proceed into S phase, including pRb phosphorylation, E2F-dependent induction of cyclin A2 expression and degradation of the Cdk inhibitor Cdkn1b (Fig. 2c). In addition, Cdk1 formed complexes with cyclin D1 as early as 12 h after serum stimulation. These complexes were observed only at later time points (beyond 24 h) in control MEFs (Fig. 2d). Thus, it is tempting to speculate that Cdk1–cyclin D complexes might be functionally relevant during mitotic exit and/or early G1 phase, a period when other cyclins are being actively targeted by the anaphase-promoting complex/cyclosome<sup>18</sup>.

Next, we investigated whether Cdk1–cyclin complexes were responsible for allowing TKO cells to enter S phase. We infected TKO MEFs with lentiviral vectors expressing either control or short hairpin RNAs (shRNAs) specific for *Cdc2a*, the locus that encodes Cdk1. Knockdown of Cdk1 had no effect on the ability of cells expressing Cdk4 and Cdk2 to exit G0 and enter S phase (Fig. 2e). However, Cdk1 depletion completely abrogated S phase entry in TKO MEFs, an effect that correlated with the inhibition of pRb phosphorylation

(Fig. 2e). These observations indicate that, in the absence of interphase Cdks, Cdk1 can be activated by D-type and/or E-type cyclins to phosphorylate pRb and bring cells out of quiescence.

Finally, we investigated whether Cdk1 was essential for cell division. To this end, we generated mutant mice that were heterozygous for *Cdc2a* from two independent embryonic stem cells that carried  $\beta$ -geo cassette insertions within this locus<sup>19,20</sup> (Fig. 3a). These integration events generate a Cdk1– $\beta$ -geo fusion protein that contains only the 12 amino-terminal residues of Cdk1 (Fig. 3b). Heterozygous *Cdc2a*<sup>+/*mut1*</sup> cells express about 50% as much Cdk1 as is present in wild-type cells (Fig. 3c). Crosses between heterozygous *Cdc2a*<sup>+/*mut1*</sup> or *Cdc2a*<sup>+/*mut2*</sup> mice did not yield homozygous *Cdc2a* mutant animals nor midgestation embryos (E10.5–E13.5) (Fig. 3d). Likewise, we could not identify E2.5 (morula stage) or E1.5 (2–4-cell) *Cdc2a*<sup>*mut1/mut1*</sup> or *Cdc2a*<sup>*mut2/mut2*</sup> embryos. Analysis of 23 morulae that were allowed to grow in culture for 5–6 days using nested primers also failed to identify homozygous *Cdc2a*<sup>*mut1/mut1*</sup> embryos (Fig. 3d). Moreover, the percentage of wild-type and *Cdc2a*<sup>+/*mut1*</sup> embryos were those expected if homozygous embryos were not viable. Finally, crosses between wild-type and *Cdc2a*<sup>+/*mut1*</sup> male and female mice yielded the expected percentage of *Cdc2a*<sup>+/*mut1*</sup> offspring (data not shown), indicating that

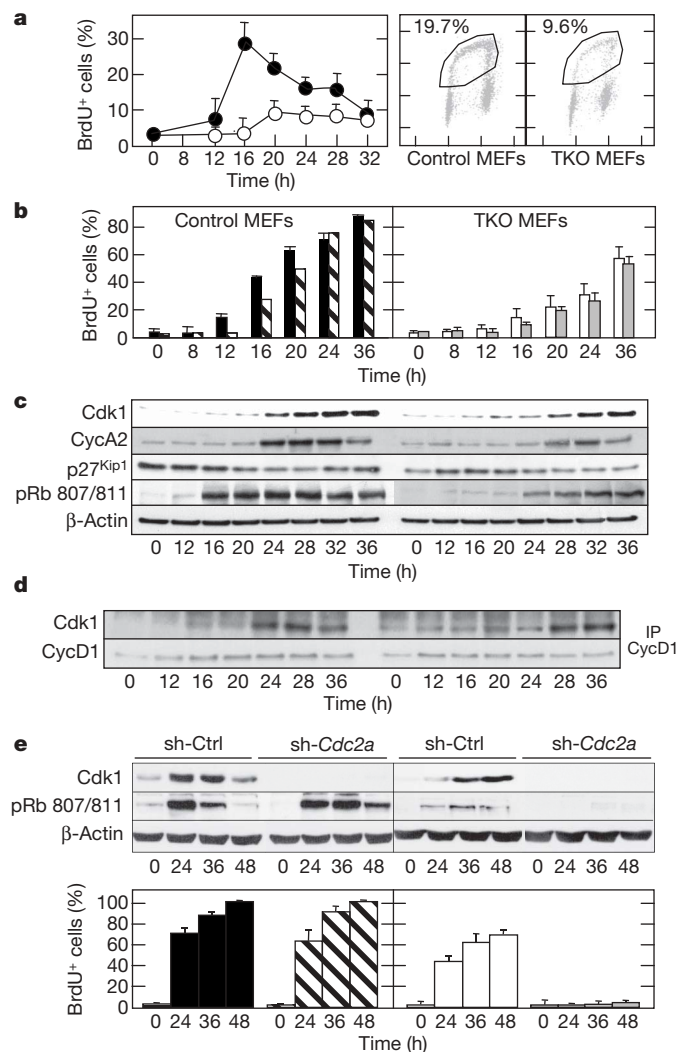


**Figure 1 | Characterization of embryos lacking all interphase Cdks.**

**a**, Embryos lacking all interphase Cdks undergo organogenesis and develop until midgestation. Left, *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> E12.5 embryos. Right, *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> E12.5 embryos. In both cases, the left image depicts a picture of the whole embryo and the right image depicts a Ki67-immunostained sagittal section ( $\times 12$ ). Scale bar, 1mm. **b**, Expression of cell cycle regulators in independent E12.5 embryos of the indicated genotype. Results from TKO embryos are shown next to results from wild-type embryos (left column). Protein extracts were analysed by immunoblotting with antibodies elicited against the indicated proteins (see Methods). Expression of  $\beta$ -actin served as loading control. **c**, Analysis of pRb phosphorylation in wild-type, *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk6*<sup>+/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> and

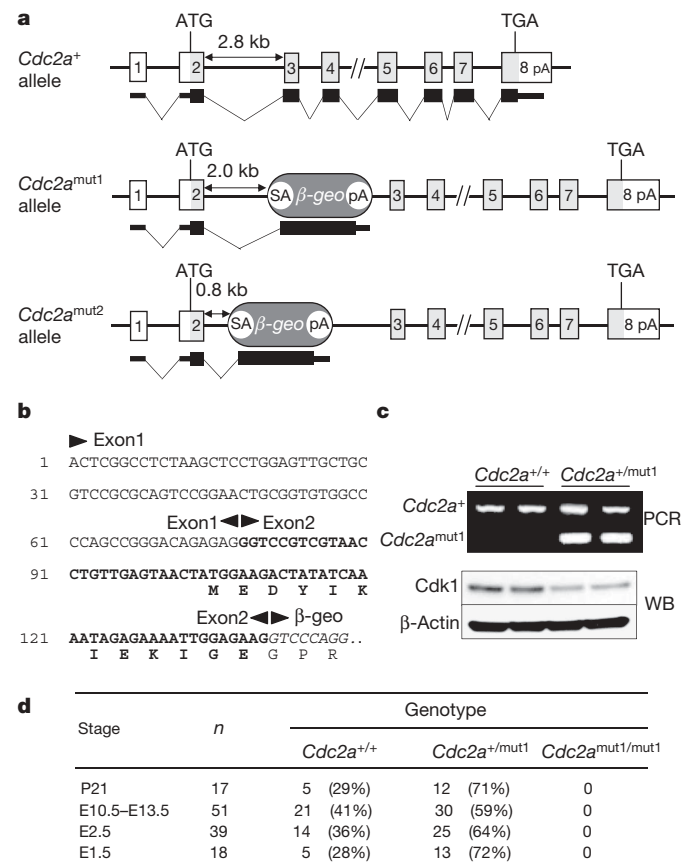
*Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> E12.5 embryos using antibodies specific for phosphorylated residues S608, S780 and S807/811. St.: pRb phosphorylation at these residues in TKO serum-starved cells. **d**, Extracts from E12.5 embryos of the indicated genotype were immunoprecipitated with antibodies against cyclin D1 (top), cyclin D2 (middle) and cyclin E1 (bottom) and analysed by immunoblotting using antiserum against Cdk1, cyclin D1 and cyclin D2 as indicated. Results from two independent embryos are shown for wild-type, TKO and double mutant embryos. M, mock immunoprecipitate; W, whole cell extract at a 1:10 dilution before immunoprecipitation. **e**, *In vitro* kinase activity associated with cyclin D2 (top) and cyclin E1 (bottom) immunoprecipitates using pRb as substrate. M, mock immunoprecipitate.

*Cdc2a*<sup>mut1</sup> oocytes and spermatozoa are viable. These observations indicate that Cdk1 is essential for the early stages of embryonic development.



**Figure 2 | Mitogenic response of TKO MEFs.** **a**, Left, percentage of quiescent *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup> (filled circles) and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> (open circles) primary MEFs in S phase after serum stimulation following 2-h BrdU pulses. Right, representative analysis of BrdU incorporation 20 h after serum stimulation of the above MEFs. Numbers indicate the percentage of BrdU<sup>+</sup> cells in S phase. **b**, Percentage of quiescent primary (solid bars) and immortal (hatched bars) *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup> control MEFs and primary (empty bars) and immortal (grey bars) *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> TKO MEFs entering S phase upon addition of 10% FBS in the continuous presence of BrdU at the indicated times after serum stimulation. Data shown as mean  $\pm$  s.d.,  $n = 3$ . **c**, Immunoblot analysis of Cdk1, cyclin A2 and p27<sup>Kip1</sup> expression and phosphorylation of S807/811 pRb residues in immortal MEFs at the indicated times after the addition of serum. Expression of  $\beta$ -actin serves as a loading control. **d**, Formation of Cdk1–cyclin D1 complexes during G0 exit in immortal MEFs shown in **b**. Extracts were immunoprecipitated using antibodies against cyclin D1 and analysed by immunoblotting using antisera against Cdk1. Immunoprecipitation of cyclin D1 is shown as a control. **e**, Knock-down of *Cdk1* abolishes G0 exit in TKO but not in control MEFs. Upper, expression of Cdk1 and phosphorylation of S807/811 pRb residues in *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup> (left) and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> (right) MEFs infected with lentiviruses expressing control (sh-Ctrl) or *Cdc2a*-specific (sh-*Cdc2a*) shRNAs, at the indicated times after serum stimulation.  $\beta$ -actin serves as a loading control. Lower, percentage of quiescent *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup> (left) and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> (right) MEFs entering S phase upon addition of 10% FBS in the continuous presence of BrdU infected with lentiviruses expressing a control shRNA (solid and empty bars, respectively) or an shRNA specific for *Cdc2a* (hatched and grey bars, respectively). Data shown as mean  $\pm$  s.d.,  $n = 3$ .

Eukaryotic evolution has endowed multicellular organisms with an increasing number of loci encoding Cdks, reaching at least 12 (and potentially 20) in mammals<sup>2</sup>. Unlike in yeasts, where Cdk1 is sufficient to drive the cell cycle, in mammals at least four additional Cdks (Cdk2, Cdk3, Cdk4 and Cdk6) have been proposed to drive the various phases of their cell cycle in sequence<sup>1,2</sup>. Recent genetic evidence has challenged some of the concepts behind this model. For instance, most laboratory strains of mice are deficient in Cdk3 owing to a naturally occurring mutation<sup>3</sup>. Moreover, Cdk4 and Cdk6 are not essential for resting cells to exit quiescence<sup>8</sup>. Likewise, cells lacking Cdk2, a kinase that was previously thought to be essential for driving the S phase, divide normally<sup>6,7</sup>. Finally, MEFs lacking Cdk4 and Cdk2 proliferate and become immortal<sup>10</sup>. *In vivo*, single and double Cdk mutant mice show proliferative defects, but only in specific cell types (Fig. 4). Moreover, as illustrated here, embryos



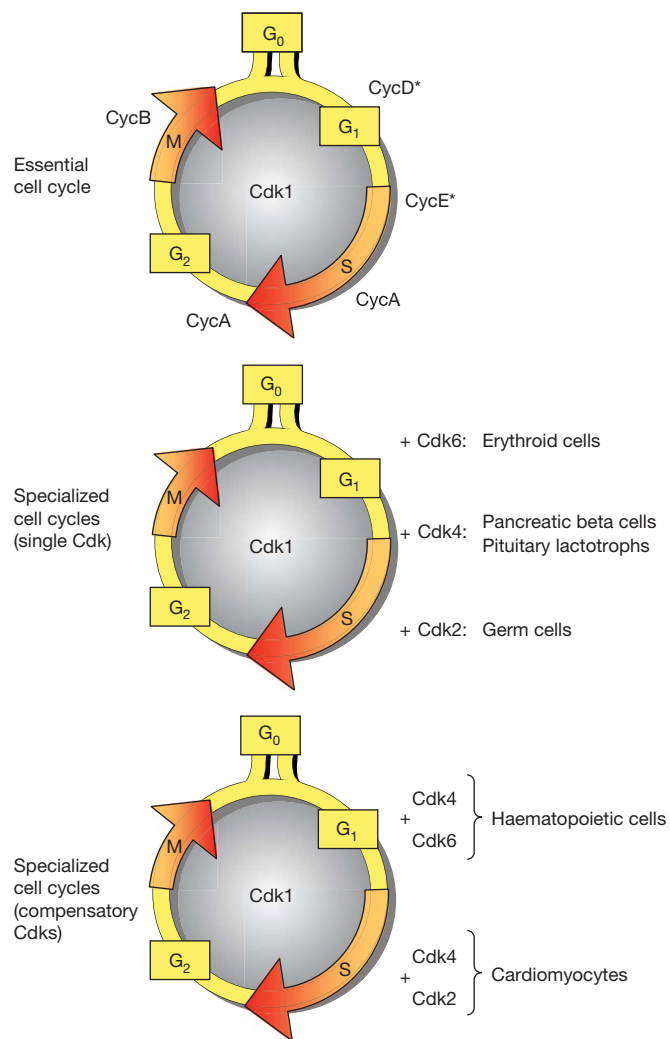
**Figure 3 | Cdk1 is essential for early embryonic development.** **a**, Schematic representation of wild type *Cdc2a*<sup>+</sup> (encoding Cdk1), *Cdc2a*<sup>mut1</sup> and *Cdc2a*<sup>mut2</sup> alleles. The mutant alleles contain an inserted  $\beta$ -geo trap cassette (dark grey) at different positions within intron 2. *Cdc2a* exons are indicated by numbered boxes. Non-coding (open boxes) and coding (light grey boxes) sequences are indicated. Thin (non-coding) and thick (coding sequences) lines represent the expected mRNAs derived from each allele. ATG, initiation codon; TGA, terminator codon; SA, splicing acceptor;  $\beta$ -geo, bacterial  $\beta$ -galactosidase/neomycin-resistance gene; pA, polyadenylation signal. **b**, Nucleotide sequence of the 5' RACE product derived from *Cdc2a*<sup>+/mut1</sup> embryonic stem cells. The boundaries of exon 1, exon 2 (bold) and  $\beta$ -geo (italics) are indicated. The amino-acid residues of the predicted Cdk1– $\beta$ -geo chimaeric protein are also indicated. Bold residues correspond to those of Cdk1. Residues in italics are those encoded by  $\beta$ -geo sequences. An additional glycine residue is expected to be generated during splicing. **c**, Top, genotyping of *Cdc2a*<sup>+/+</sup> and *Cdc2a*<sup>+/mut1</sup> mice by PCR amplification of *Cdc2a*<sup>+</sup> and *Cdc2a*<sup>mut1</sup> alleles. Bottom, western blot (WB) analysis of Cdk1 protein levels in primary *Cdc2a*<sup>+/mut1</sup> and wild-type MEFs. **d**, Number of mice (P21) and embryos (E10.5–E13.5, E2.5 and E1.5) of the indicated genotype derived from crosses between *Cdc2a*<sup>+/mut1</sup> mice. Percentage of *Cdc2a*<sup>+/+</sup> and *Cdc2a*<sup>+/mut1</sup> mice and embryos is indicated in parentheses.



lacking all interphase Cdks undergo organogenesis and develop to midgestation, indicating that Cdk1 can drive the essential cell cycle (Fig. 4). Indeed, only mice lacking Cdk1 (this study), cyclin A2 and possibly cyclin B1 have impaired cell division during the very early stages of embryonic development<sup>21,22</sup>, which indicates that Cdk1 kinase activity cannot be compensated by interphase Cdks.

These observations suggest that Cdks display a significant degree of plasticity. As shown here, Cdk1 can interact with all cyclins, a property that was previously thought to be unique to unicellular organisms. More importantly, these Cdk1 complexes are biochemically active. But these interactions, at least *in vitro*, are only observed in the absence of their 'cognate' Cdk, mainly Cdk4 and Cdk2 (Fig. 1d). Thus, if these preferred Cdk–cyclin interactions also occur *in vivo*, Cdk1 would only drive interphase in the absence of the other Cdks (Fig. 4). A possible resolution to this issue might be provided by strains of mice that express kinase-inactive Cdks rather than null alleles.

Genetic analysis does not explain how Cdk1 can compensate for the absence of interphase Cdks during embryonic development, the most active period of cell division, but not in certain specialized cell types. The



**Figure 4 | Summary of genetic results obtained by ablation of loci encoding cell-cycle Cdks in mice.** The diagram depicting the 'essential cell cycle' (top) is based on our results. The asterisks indicate that D-type or E-type cyclins are not essential for cell proliferation<sup>11–14</sup>. It is not known whether cells expressing Cdk1 in the absence of D-type and/or E-type cyclins would proliferate. The cartoons depicting 'specialized cell cycles' summarize previous work illustrating which interphase Cdk (middle) or Cdks (bottom) are essential for proliferation of the indicated cell types. The location of Cdks within the phases of the cell cycle is arbitrary. Cyclins have been omitted for clarity. References can be found in the text.

most plausible explanation is that interphase Cdks, but not Cdk1, phosphorylate substrates that are unique to those cell types in which they are essential. It is also possible that in these specialized cells, only interphase Cdks can generate the necessary levels of kinase activity to drive cell division. This scenario might explain why TKO MEFs achieve normal levels of cell proliferation only in the presence of SV40 T<sub>121</sub>, which inactivates the Rb family of proteins (Supplementary Fig. 3c). A precise understanding of how each Cdk contributes to drive cell division should help us to develop appropriate therapeutic strategies to treat cancer as well as other diseases caused by aberrant cell proliferation.

## METHODS SUMMARY

**Gene targeting and mouse strains.** *Cdk4*<sup>-/-</sup>, *Cdk2*<sup>-/-</sup>, *Cdk6*<sup>-/-</sup> and *Cdk2*<sup>lox</sup> mice have been described<sup>6,8,10</sup>. *Cdc2a*<sup>+/-mut1</sup> embryonic stem cells were obtained in a gene trap screen<sup>19</sup> and *Cdc2a*<sup>+/-mut2</sup> embryonic stem cells were obtained from the German Gene Trap Consortium<sup>20</sup>.

**Cell culture assays.** MEFs were isolated from E12.5 embryos. All cell culture experiments were carried out in fibronectin-coated plates (Becton Dickinson) and 3% oxygen. MEFs were propagated according to standard 3T3 protocols. For proliferation assays, we plated  $5 \times 10^4$  cells on six-well plates in duplicate as described<sup>23</sup>. To analyse S phase entry, we deprived MEFs of serum for 72 h in DMEM plus 0.1% FBS and re-stimulated them with 10% FBS. Cells were either pulsed (2 h) or continuously labelled with 50  $\mu$ M bromodeoxyuridine, harvested at the indicated times and stained with anti-BrdU fluorescent antibodies. MEFs were infected with retroviral vectors as described<sup>23</sup>. Knockdown of *Cdc2a* was achieved with lentiviral shRNA delivery. After infection, cells were selected with 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> puromycin for 72 h in DMEM plus 0.1% FBS and re-stimulated with 10% FBS.

**Analysis of haematopoietic precursors.** Livers were collected from E12.5–E13.5 embryos and disrupted to form single-cell suspensions. Cells were immunostained and haematopoietic progenitors identified as described<sup>8</sup>.

**Protein analysis.** Protein lysates from either whole embryos or cells were prepared and used for immunoblotting as described<sup>23</sup>. For kinase assays, 300  $\mu$ g of whole-cell extract was immunoprecipitated and the resulting immunoprecipitates were incubated with 1  $\mu$ g of mouse pRb protein fragment or histone H1 as substrates<sup>23</sup>. Cdk–cyclin complexes were analysed by immunoprecipitation of 300  $\mu$ g of whole-embryo extracts.

**Full Methods** and any associated references are available in the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

Received 14 May; accepted 21 June 2007.

- Bloom, J. & Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 149–160 (2007).
- Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630–641 (2005).
- Ye, X., Zhu, C. & Harper, J. W. A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 1682–1686 (2001).
- Rane, S. G. *et al.* Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in  $\beta$ -cell hyperplasia. *Nature Genet.* **22**, 44–52 (1999).
- Tsutsui, T. *et al.* Targeted disruption of Cdk4 delays cell cycle entry with enhanced p27<sup>Kip1</sup> activity. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7011–7019 (1999).
- Ortega, S. *et al.* Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature Genet.* **35**, 25–31 (2003).
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L. & Kaldis, P. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* **13**, 1775–1785 (2003).
- Malumbres, M. *et al.* Mammalian cells cycle without the D-type Cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493–504 (2004).
- Berthet, C. *et al.* Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev. Cell* **10**, 563–573 (2006).
- Barriere, C. *et al.* Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Mol. Oncology* **1**, 72–83 (2007).
- Kozar, K. *et al.* Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, 477–491 (2004).
- Geng, Y. *et al.* Kinase-independent function of cyclin E. *Mol. Cell* **25**, 127–139 (2007).
- Geng, Y. *et al.* Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**, 431–443 (2003).
- Parisi, T. *et al.* Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* **22**, 4794–4803 (2003).
- Zarkowska, T. & Mittnacht, S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **272**, 12738–12746 (1997).
- Aleem, E., Kiyokawa, H. & Kaldis, P. Cdc2-Cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature Cell Biol.* **7**, 831–836 (2005).

17. Saenz-Robles, M. T., Symonds, H., Chen, J. & Van Dyke, T. Induction versus progression of brain tumor development: differential functions for the pRB- and p53-targeting domains of simian virus 40 T antigen. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2686–2698 (1994).
18. Fung, T. K. & Poon, R. Y. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 335–342 (2005).
19. Sutherland, H. G. *et al.* Large-scale identification of mammalian proteins localized to nuclear sub-compartments. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1995–2011 (2001).
20. Schnutgen, F. *et al.* Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 7221–7226 (2005).
21. Murphy, M. *et al.* Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nature Genet.* **15**, 83–86 (1997).
22. Brandeis, M. *et al.* Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 4344–4349 (1998).
23. Martin, A. *et al.* 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 (2005).

**Supplementary Information** is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Acknowledgements** This work is dedicated to the memory of our colleagues L. Gómez García and J. López Navarro. We thank R. González, M. San Román, B. Velasco and R. Villar for technical assistance, A. García for help with the

cytometer, and A. Swat and S. Mouron for advice on quantitative RT-PCR. We also value the support provided by the Transgenic and Comparative Pathology Units of the CNIO. We thank M. Puyol for the Cdk2 and Cdk6 antibodies. This work was supported by grants from the Plan Nacional de Investigación Científica (D.S., M.M. and M.B.), the OncoCycle programme from the Comunidad de Madrid (M.M. and M.B.), Fondo de Investigación Sanitaria (D.S.), V Framework Programme of the European Union (M.B.) and INSERM and Association pour la Recherche contre le Cancer (P.D.). C.T., C.B. and A.C. were supported by fellowships from FEBS, la Ligue contre le Cancer (Comité de la Dordogne) and FPI (Ministerio de Educación y Ciencia), respectively.

**Author Contributions** M.B. supervised the entire project. M.B., D.S. and M.M. conceived and designed the experiments, and wrote the manuscript with comments from co-authors. C.B. generated the mouse strains and carried out most cell culture experiments and part of the protein analysis. A.C. was responsible for most protein analysis and part of the cell culture experiments. S.H. and C.T. characterized *Cdc2a* mutant mice. P.D. was responsible for histopathological analysis. J.F.C. and K.N. generated one of the *Cdc2a* mutant embryonic stem cell clones.

**Author Information** Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B. ([mbarbacid@cniio.es](mailto:mbarbacid@cniio.es)).

## METHODS

**Gene targeting and mouse strains.** *Cdk4*<sup>-/-</sup>, *Cdk2*<sup>-/-</sup>, *Cdk6*<sup>-/-</sup> and *Cdk2*<sup>lox</sup> mice have been described<sup>6,8-10</sup>. *Cdc2a*<sup>+/-mut1</sup> embryonic stem (ES) cells were obtained in a gene trap screen<sup>19</sup>. Neo<sup>R</sup> colonies were screened for β-galactosidase activity with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactosidase (X-Gal) and analysed by immunofluorescence using antibodies specific for β-gal. To characterize the trapped allele, we prepared total RNA using Bio/RNA-X-cell (Bio/Gene Limited). 5' RACE products were generated and directly sequenced using Big DyeTM terminator kit using a -40 lacZ primer (USB/Amersham) on an ABI prism 377 DNA sequencer. *Cdc2a*<sup>+/-mut2</sup> ES cells were obtained from the German Gene Trap Consortium (clone P009F08; <http://www.genetrap.org>). The sequence of the oligonucleotides used for genotyping is available upon request. Mice used in this study have been maintained in a mixed 129/SvJ x C57BL/6J background according to the Guide of the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR 1996) and in accordance with the Spanish Animal Protection Law (RD1201/2005) and the European Directive (86/609/CEE) established by the European Union to regulate animal care standards.

**Histopathology and immunohistochemistry.** Embryos were fixed in 10%-buffered formalin (Sigma) and embedded in paraffin. Three- or five-micrometer-thick sections were stained with haematoxylin and eosin. For proliferation studies, tissue sections were stained with Ki67-specific antibodies (MIB-1; Dako). Apoptotic cells were detected using anti-active Caspase 3 antibodies (R&D Systems).

**Cell culture assays.** MEFs were isolated from E12.5 embryos and cultured in fibronectin-coated plates (Becton Dickinson) and 3% oxygen in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). MEFs were propagated according to standard 3T3 protocols. For proliferation assays,  $5 \times 10^4$  cells were plated on six-well plates in duplicate as described<sup>23</sup>. To analyse S phase entry, we deprived MEFs ( $10^6$  cells per 10-cm dish) of serum for 72 h in DMEM plus 0.1% FBS and re-stimulated with 10% FBS. Cells were either pulsed (2 h) or continuously labelled with 50 μM bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma), harvested at the indicated times and stained with anti-BrdU fluorescent antibodies (Becton Dickinson). MEFs were infected with retroviral vectors as described<sup>23</sup>. Knockdown of *Cdc2a* was mediated with lentiviral Mission-shRNA plasmids (SHGLY-NM\_007659, Sigma) according to the manufacturer's instructions. After infection, cells were selected with 2 μg ml<sup>-1</sup> puromycin for 72 h in DMEM plus 0.1% FBS and re-stimulated with 10% FBS.

**Analysis of haematopoietic precursors.** Livers were collected from E12.5–E13.5 embryos and disrupted to form single-cell suspensions. Cells were immunostained and haematopoietic progenitors identified as described<sup>8</sup>. Haematopoietic stem cells were gated as Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>; common myeloid progenitors as Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>FcγR<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>; granulocyte-macrophage progenitors as Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>FcγR<sup>hi</sup>CD34<sup>+</sup>; and megakaryocyte-erythroid progenitors 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 using a FACSAria (Becton Dickinson) cytometer.

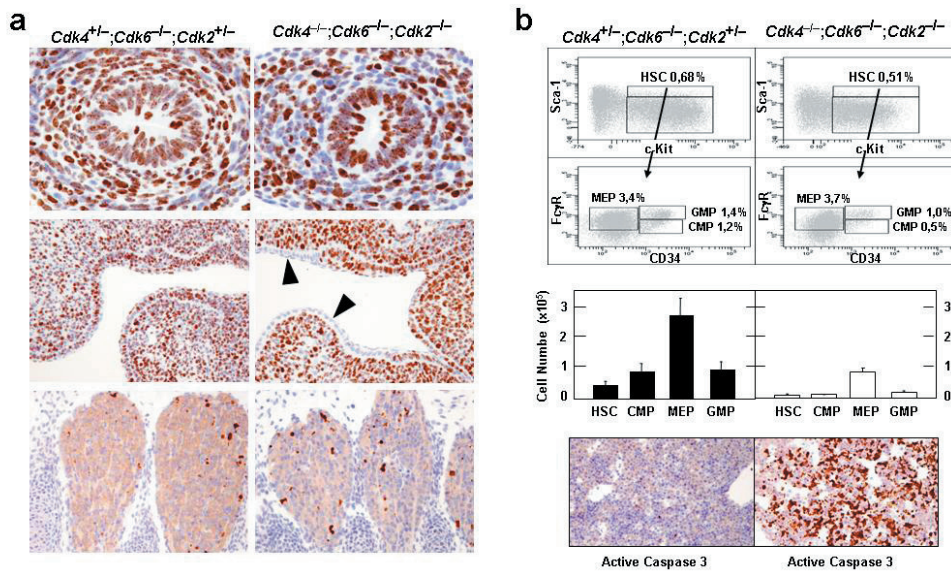
**Protein analysis.** Protein lysates were prepared and used for immunoblotting as described<sup>23</sup>. Antibodies against the following proteins were used: Cdk1 (17; Santa Cruz), Cdk4 (C22; Santa Cruz), Cdk2 and Cdk6 (our own rabbit polyclonal antibodies), Cdk7 (C22; Santa Cruz), Cdk9 (C22; Santa Cruz), Cyclin A2 (H432; Santa Cruz), Cyclin B1 (Santa Cruz), Cyclin D1 (DCS6 and AB4; Neo Markers), Cyclin D2 (Santa Cruz), Cyclin E1 (M20; Santa Cruz), p21<sup>Cip1</sup> (C19; Santa Cruz), p27<sup>Kip1</sup> (Transduction Laboratories), p57<sup>Kip2</sup> (C20; Santa Cruz), β-Actin (AC15, Sigma) and pRb (BD Pharmingen). pRb phosphospecific antibodies to phosphorylated residues S608 (#2181), S780 (#9307) and S807/811 (#9308) were from Cell Signaling. As secondary antibodies, we used peroxidase-conjugated IgG (Dako), followed by chemiluminescence detection (ECL; Amersham). For kinase assays, 300 μg of whole cell extract was immunoprecipitated with the indicated antibodies and the resulting immunoprecipitates incubated with 1 μg of mouse pRb protein fragment (amino-acid residues 769–921; Santa Cruz) or histone H1 (calf thymus, Roche) as substrates<sup>23</sup>.

***Cdkn1b* expression analysis by real-time quantitative PCR.** Total RNA was isolated from cells using RNAeasy (Quiagen) and digested with DNaseI to remove contaminating DNA. cDNA was prepared from 2 μg of total RNA using Superscript II Reverse transcriptase kit (Invitrogen). Real-time PCR was performed on several cDNA dilutions plus 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 50 nM of *Cdkn1b* primers (sequence available upon request). Reactions were carried out using an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) for 40 cycles (95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min) after an initial 10-min incubation at 95 °C. Variation of *Cdkn1b* expression was calculated using the ΔΔCt method<sup>24</sup> with *β-actin* mRNA as an internal control.

24. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Methods* 25, 402–408 (2001).

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

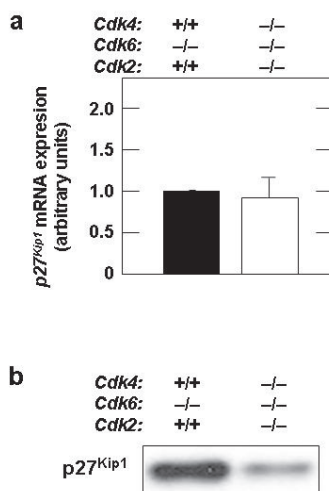
Figure S1



**Figure S1: Further characterization of embryos lacking all interphase Cdk. a**, Cell proliferation and apoptosis in *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> embryos. Top and middle, Ki67 immunostained sections of midgut (top) and stomodeum (middle) of *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> (left) and *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (right) E12.5 embryos (x200). Note that a subset of epithelial cells located at the boundary between the future oral mucosae and the surface ectoderm (middle) fail to proliferate in all E12.5 TKO embryos examined (arrowheads). These observations underscore the exquisite dependency on interphase Cdk of certain cell types. Bottom, Active caspase 3 immunostaining of dorsal root ganglion sections of *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> (left) and *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (right) E12.5 embryos (x400). **b**, Hematopoietic defects in *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos. Top, Analysis of

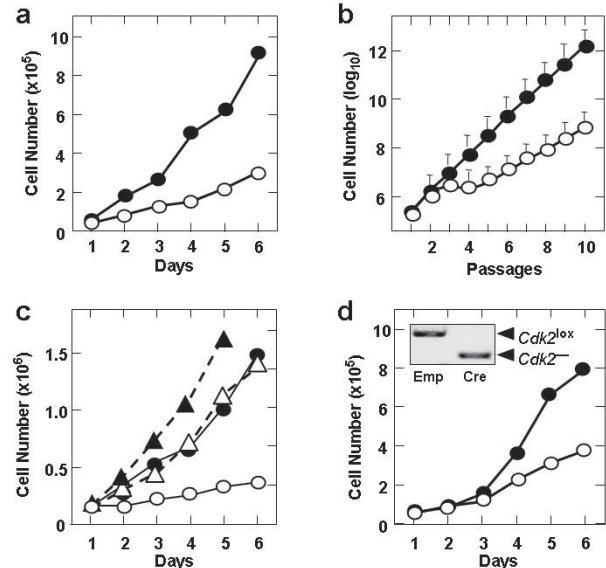
hematopoietic stem cells and lineage committed progenitors in E12.5-E13.5 embryos. Cells were isolated from fetal livers and analysed by flow cytometry. The percentages of hematopoietic stem cells (HSC), granulocyte-macrophage progenitors (GMP), common myeloid progenitors (CMP) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) are shown. Middle, Absolute cell numbers of HSC, CMP, MEP and GMP per fetal liver in *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> (solid bars) and *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (empty bars) littermates. Error bars: SD. Bottom, Active Caspase 3 staining of liver sections showing extensive immunoreactivity (apoptosis) in a E14.5 *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryo (right), but not in a *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> littermate (left).

Figure S2



**Figure S2: *p27*<sup>Kip1</sup> mRNA levels in *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos.** **a**, Relative levels of *p27*<sup>Kip1</sup> mRNA in *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> E12.5 embryos (n=5; empty bars) versus *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> embryo littermates (n=2; solid bars). Error bars: SD. **b**, Expression levels of *p27*<sup>Kip1</sup> protein as determined by Western blot analysis of two of the embryos used to determine mRNA levels.

Figure S3



**Figure S3: Proliferative properties of TKO MEFs. a**, Growth curve of primary MEFs obtained from *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> (filled circles) and *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (open circles) embryos. **b**, Immortalization of *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> (filled circles) and *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (open circles) MEFs derived from

four independent embryos by continuous passage following a 3T3 protocol. Error bars: SD. **c**, Growth curve of primary *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> (filled symbols) and *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (open symbols) MEFs infected with empty retroviruses (circles, solid lines) or with retroviruses expressing T<sub>121</sub>, a fragment of the SV40 large T antigen (triangles, dotted lines). **d**, Growth curve of *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>lox/lox</sup> MEFs infected with empty retroviruses (filled circles) or with retroviruses expressing Cre recombinase (open circles). Inset, shows PCR products derived from floxed *Cdk2*<sup>lox</sup> and null *Cdk2* alleles (arrowheads) in cultures infected with empty (Emp) and Cre (Cre) expressing retroviruses.

**Table S1. Genotypes of embryos obtained from crosses between *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> mice\*.**

Embryo stage	Total embryos	Genotype								
		<i>Cdk4</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cdk6</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cdk2</i> <sup>+/+</sup>			<i>Cdk4</i> <sup>+/-</sup> ; <i>Cdk6</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cdk2</i> <sup>+/-</sup>			<i>Cdk4</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cdk6</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cdk2</i> <sup>-/-</sup>		
		Observed	Live	Expected†	Observed	Live	Expected	Observed	Live	Expected
E12.5	90	19 (22%)	all	22 (25%)	50 (55%)	all	45 (50%)	21 (23%)	all	22 (25%)
E13.5	93	28 (30%)	27 (29%)	23 (25%)	45 (48%)	all	47 (50%)	20 (22%)	15 (16%)	23 (25%)
E14.5	57	13 (23%)	all	14 (25%)	30 (52%)	all	29 (50%)	14 (25%)	3 (5%)	14 (25%)
E15.5	26	9 (25%)	all	4 (25%)	22 (61%)	all	9 (50%)	5 (14%)	none	4 (25%)

\* The *Cdk4* and *Cdk2* alleles co-segregate due to their close proximity in the mouse genome

† Number of expected mice has been rounded to the next whole number

Percentages are referred in all cases to the total number of embryos obtained for each developmental stage