

Universitat de Barcelona

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

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

**Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Oriol Bachs i
Valldeneu, en el Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia
Patològica de la Facultat de Medicina.**

Barcelona, Febrer de 1998

ÍNDEX.

ÍNDEX

	Pag. N°:
Introducció:	1
1. Introducció al cicle cel.lular.	1
1.1 Definició de cicle cel.lular.	1
1.2 Fases del cicle cel.lular.	2
1.3 Els senyals externs i el cicle cel.lular.	2
1.4 Els factors de creixement i la transducció del senyal proliferatiu.	2
1.5 El punt de restricció.	4
1.6 Estudi del cicle cel.lular en <i>Xenopus</i> , llevats i eucariotes superiors.	5
2. Regulació del cicle cel.lular en eucariotes superiors I: les cdks.	6
2.1 Estructura de les cdks.	6
2.2 Regulació de l'activitat de les cdks.	9
2.2.1 Activació de les cdks per unió a les ciclines.	9
Estructura de els ciclines.	9
Funció dels complexos cdks/ciclines.	11
Cdk4, cdk6 i les ciclines D: control de G1 i G1/S.	11
E2F i les proteïnes <i>pocket</i> .	
Cdk2 i ciclina E: control de G1/S.	15
Cdk2 i ciclina E i cdk2 i ciclina A: control de la fase S.	16
Les factories de replicació i la matriu nuclear.	20
Cdc2 i ciclina A: Control de G2.	23
Cdc2 i ciclina B: Control de la mitosi.	23
Cdk5 i p35.	25
Cdk3.	25
Cdk8 i ciclina C.	25
Altres cdks i ciclines.	26

2.2.2	Activació de les cdks per fosforilació.	26
	Fosforilació de la treonina 160/161. Cdk7 (CAK)/cyclina H.	26
	Fosforilació de la treonina 14 i la tirosina 15.	
	WEE 1 i CDC25.	27
2.2.3	Inhibició de les cdks per unió a proteïnes inhibidores.	28
	P21.	29
	P27.	32
	P57.	32
	P16.	32
	P15.	33
	P14, p18.	34
2.2.4	Substrats de les cdks.	34
2.3	Senyals externs: L'adhesió a la matriu extracel.lular.	36
2.4	Senyals externs: la inhibició per contacte.	37
3.	Regulació del cycle cel.lular en eucariotes superiors II.	37
	Els sistemes de vigilància (<i>ckeckpoints</i>).	37
4.	La regeneració hepàtica i el cycle cel.lular.	40
4.1	El fetge.	40
4.2	Característiques de la regeneració hepàtica.	42
4.2.1	L'hepatectomia parcial (HP).	42
4.2.2	El cycle cel.lular durant la regeneració hepàtica.	43
4.2.3	La funcionalitat del fetge durant la regeneració.	43
4.2.4	Els factors de creixement durant la proliferació hepàtica.	44
4.2.5	Els <i>priming</i> o sensibilització.	46
4.2.6	La maquinària reguladora del cycle cel.lular..	48

Objectius.	49
Resultats.	50
Capítol I.	51
Capítol II.	81
Capítol III.	97
Capítol IV.	111
Discussió.	143
Conclusions.	165
Bibliografia.	169

INTRODUCCIÓ.

Introducció

El cicle cel.lular

1. Introducció al cicle cel.lular

1.1 Definició de cicle cel.lular.

El cicle cel.lular es defineix com el conjunt ordenat d'esdeveniments que es succeeixen en una cèl.lula i tenen com a finalitat la divisió cel.lular. L'origen de l'estudi del cicle cel.lular el podríem datar entre els anys 1838 i 1855, quan Schleiden i Schwann van formular l'anomenada "*teoria cel.lular*" la qual postula que "*qualsevol organisme està compost per cèl.lules*", i Virchow va enunciar el seu axioma: "*tota cèl.lula prové d'una altra preexistent*". Les bases definitives per assolir l'actual coneixement sobre el cicle cel.lular i els processos que el regulen es van establir al segle XX gràcies al descobriment del DNA com a portador de la informació genètica, i amb la caracterització de les proteïnes del citoesquelet responsables de la segregació dels cromosomes.

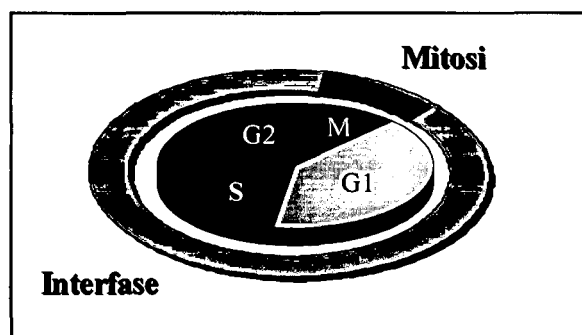


Fig 1. Fases del cicle cel.lular.

1.2 Fases del cycle cel.lular.

Dins d'un organisme pluricel.lular adult hi ha tres tipus de poblacions cel.lulars: cèl.lules que sempre estan proliferant (epitelials, etc.), poblacions que no proliferen mai (neurones, múscul esquelètic, etc.) i poblacions cel.lulars anomenades de bescanvi lent. Aquestes últimes estan en un estadi anomenat quiescència o G0. Com a resposta a senyals extracel.lulars aquestes cèl.lules entren en el cycle cel.lular. Esquemàticament podem dividir el cycle cel.lular en dues fases totalment diferenciades i de duració variable segons el tipus de cèl.lula: la fase de preparació o interfase i la fase de divisió o mitosi. Durant la interfase trobem en primer lloc l'anomenat *gap* G1 en el qual la cèl.lula avalua la possibilitat de continuar la divisió cel.lular, incrementa la seva mida i sintetitza els enzims encarregats de la replicació del DNA. Si les condicions no fossin les adients per a la divisió o si els mecanismes encarregats detectessin algun error, la cèl.lula aturaria el cycle i retornaria a l'estat de quiescència anterior a G1. Una vegada replicat el DNA durant la fase S, la cèl.lula entra en el *gap* G2 en el qual comprova la correcta duplicació del material genètic i es prepara per a la divisió. Finalment té lloc la fase de mitosi d'on resulten les dues cèl.lules filles.

1.3 Els senyals externs i el cycle cel.lular.

Diferents tipus de senyals externs determinen l'entrada o la sortida del cycle cel.lular. Aquests senyals es poden agrupar en tres blocs segons els seus agents determinants: els factors de creixement, el contacte intercel.lular i l'adhesió a la matriu extracel.lular. Les vies de transducció d'aquests senyals encara són poc conegudes.

1.4 Els factors de creixement i la transducció del senyal proliferatiu.

Els factors de creixement són proteïnes presents al medi extracel.lular responsables de disparar el senyal mitogènic que provoca que una cèl.lula quiescent entri al cycle cel.lular o que una cèl.lula ciclant (G1) no retorni a l'estat de quiescència. Existeixen sistemes complexes de transducció que connecten aquests senyals

extracel·lulars que rep la cèl·lula amb la maquinària reguladora del cicle cel·lular. Cal dir que certs factors de creixement també poden enviar senyals negatives dins la cèl·lula i aturar la proliferació.

Quan els factors de creixement s'uneixen als seus receptors de membrana generen un senyal proliferatiu que es tradueix de diferents maneres segons la via. Hi ha tres tipus de receptors a la superfície cel·lular: els associats a canals iònics, els associats a proteïnes G i els que presenten activitat enzimàtica. Dins els darrers hi ha els que tenen activitat tirosina quinasa i els que tenen activitat serina-treonina quinasa associada al seu domini intracel·lular.

En el cas dels que tenen activitat tirosina quinasa la unió del factor de creixement (EGF, PDGF, HGF, etc.) al seu receptor provoca l'autofosforilació del receptor. Els residus fosforilats funcionen com a llocs d'alta afinitat pels dominis SH2 i SH3 (Pawson and Guish, 1992) presents a moltes proteïnes. Per exemple la proteïna Grb2 s'uneix al receptor fosforilat a través del domini SH2 i a la proteïna SOS (proteïna alliberadora de nucleòtids de guanina) pel domini SH3. El complex Grb2/SOS activa Ras i dispara la via de transducció que inclou *Raf*, MEK, i ERK (MAPK) entre d'altres (Blenis, 1993; Waskeiewicz and Cooper, 1995).

Com exemple de receptor serina-treonina quinasa trobem el receptor pel factor de creixement transforming growth factor β (TGF- β) que pot actuar com a inhibidor de la proliferació en certs tipus cel·lulars. Aquest receptor està compost per dues proteïnes anomenades tipus I i II. TGF- β s'uneix al receptor tipus II el qual reconeix i fosforila el de tipus I. Aquest s'activa i fosforila la proteïna Smad 2 que reconeix, encara en el citoplasma, la Smad 4 / DPC4 i juntes transloquen al nucli. Dins el nucli, s'associen a les proteïnes de la família de DNA *binding proteins* FAST-1 i activen la transcripció de gens diana (revisat a Massagué et al., 1997). Recentment, també s'ha descrit que les proteïnes ERKK de la via EGF-ras fosforilen les Smad2 fet que bloqueja l'entrada al nucli (Kretschmar, et al., 1997).

La majoria d'aquests sistemes de transducció de senyals tenen com a destí final proteïnes reguladores de la transcripció gènica. Hi ha gens de resposta immediata a l'acció dels factors de creixement que no depenen de la síntesis proteica. És el cas de *fos*, *myc* i *jun* els quals presenten un pic d'expressió molt curt a principis de G1 i actuen com factors de transcripció d'altres gens d'expressió més tardana. Els gens

d'expressió tardana depenen de síntesi proteica i inclouen les cdks i les ciclins. Dins d'aquests cal diferenciar els gens que s'activen a mig G1 i els que ho fan a la fase G1 tardana. Entre els gens de mig G1 trobem el factor de transcripció p53, la calmodulina i el gen *ras*. Els gens que s'expressen a final de G1 són el que codifiquen per proteïnes necessàries per la síntesi del DNA com les DNA polimerases, el PCNA i d'altres.

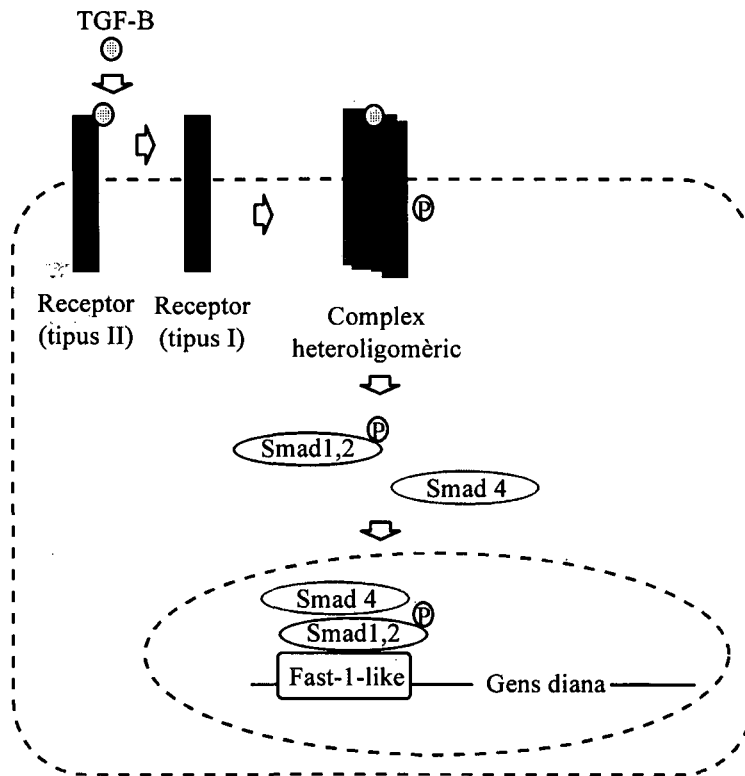


Fig 2. Via de transducció del senyal de TGF- β (Massagué, et al 1997).

1.5 El punt de restricció.

El punt de restricció (R) (en llevats anomenat START) es defineix com aquell moment del G1 a partir del qual la cèl.lula avança en el cicle independentment de l'estímul dels factors de creixement (Pardee, 1974). A partir de R la cèl.lula està compromesa a finalitzar aquell cicle. Així, en un cultiu en G1 que ha estat privat de factors de creixement, o bé, ha estat tractat amb inhibidors de la síntesi proteica, s'observen dues poblacions cel.lulars: una població de cèl.lules aturades en el cicle (més properes a l'anterior mitosis) i una altra no afectada (cèl.lules distanciades més de 4 hores de l'anterior mitosis). Les cèl.lules aturades entren a G0 i una vegada

s'afegeixen nous factors de creixement al medi, necessiten unes 8 hores per retornar al punt de G1 en el qual estaven abans de l'alliberament dels mitògens. Les cèl·lules transformades responen a alguns inhibidors que les atura a G1 (no entren a G0), però en general, no a la manca de factors de creixement.

1.6 Estudi del cicle cel·lular en *Xenopus*, llevats i eucariotes superiors.

Els avenços en el coneixement del cicle cel·lular s'han realitzat gràcies als estudis duts a terme en diferents tipus d'organismes:

Les femelles de la granota *Xenopus* produeixen ous de mida gran (1 mm diàmetre) que poden ser fertilitzats *in vitro* i que donen lloc a una població de cèl·lules que avancen sincrònicament a través de successius cicles cel·lulars. Aquests cicles consisteixen en una alternància de fases S i de mitosis sense els *gaps* G1 i G2. Les divisions es realitzen sense creixement gràcies al magatzem de nutrients acumulats a la cèl·lula mare. Els oocits són les cèl·lules diploids que donen lloc a aquests ous haploids, mitjançant la meiosi, prèvia estimulació amb l'hormona progesterona. Experiments de microinjecció de citoplasma d'ou a oocits, donaven com a resultat la maduració de l'oocit de la mateixa manera que si hagués estat tractat amb progesterona. A aquesta activitat inductora de la maduració se la va anomenar factor promotor de la maduració (MPF). La maduració dels oocits també tenia lloc si se'ls injectava amb citoplasma de cèl·lules de mamífer aturades en mitosi. Altres estudis van descriure que els nivells d'aquest factor fluctuaven durant els cicles meiòtic i mitòtics amb un pic màxim de concentració en la metafase i que l'activitat del MPF era dependent de la síntesi proteica (Gerhart, 1984). Aquests fets van fer pensar que el MPF era un element clau en la regulació del cicle cel·lular. La purificació de MPF va donar com a resultat que el factor estava format per dos polipèptids de 32 kDa i 45 kDa amb activitat histona H1 quinasa (Lohka, et al., 1988).

Els llevats *Saccharomyces cerevisiae* (llevats de gemació) i *Schizosaccharomyces pombe* (llevats de fissió) han resultat de gran utilitat a l'hora de realitzar estudis genètics a nivell de cicle. El clonatge i seqüenciació de gens mutants que donaven fenotips aturats en algun dels estadis del cicle cel·lular a temperatures restrictives (mutants *cdc*) va dur al descobriment d'una proteïna quinasa (*cdc2* a *S.*

pombe i CDC28 a *S. cerevisiae*) essencial en el control del cicle cel.lular a les transicions G1/S i G2/ M (Nurse and Bisset, 1981; Beach, et al.,1982). Els anticossos contra aquesta proteïna reconeixien també el MPF de *Xenopus* (Gautier, et al., 1988). La proteïna homòloga humana a cdc2 es va clonar gràcies a la seva habilitat de complementar a mutants cdc2 i CDC28 de llevat (Lee and Nurse, 1987).

Encara que a eucariotes superiors la cdc2 controla només la transició G2/M, existeix una família multigènica que codifica per diferents proteïnes quinasa homòlogues a cdc2 anomenades cdks i responsables del control del cicle cel.lular en aquests organismes.

2. Regulació del cicle cel.lular en eucariotes superiors

I: les cdks.

La progressió de les cèl.lules eucariotes en el cicle cel.lular està regulada per l'activació i inhibició seqüencial d'un conjunt de proteïnes quinasa anomenades quinases depenents de ciclins o cdks. Les cdks controlen l'estat de fosforilació de certes proteïnes la qual cosa regula la seva activitat, acoblament i localització intracel.lular. Addicionalment la cèl.lula té uns sistemes de detecció anomenats *checkpoints* que controlen la correcció dels esdeveniments que es van succeint. La detecció d'un error dispara les senyals d'inhibició necessàries per aturar el cicle en aquell punt .

2.1 Estructura de les cdks

Les cdks presenten un nucli catalític format per 250-300 residus d'aminoàcids. Existeix un 55 %-65 % d'homologia en la seqüència primària de les diferents cdks conegudes. A la figura 3 es comparen les seqüències de quatre cdks: HsCDK2, cdk2 humana; HsCDC2, cdc2 humana; SpCDC2, cdc2 de *S. pombe* i ScCDC28, cdc2 de *S. cerevisiae* (De Bondt, et al., 1993 i Morgan , et al., 1994).

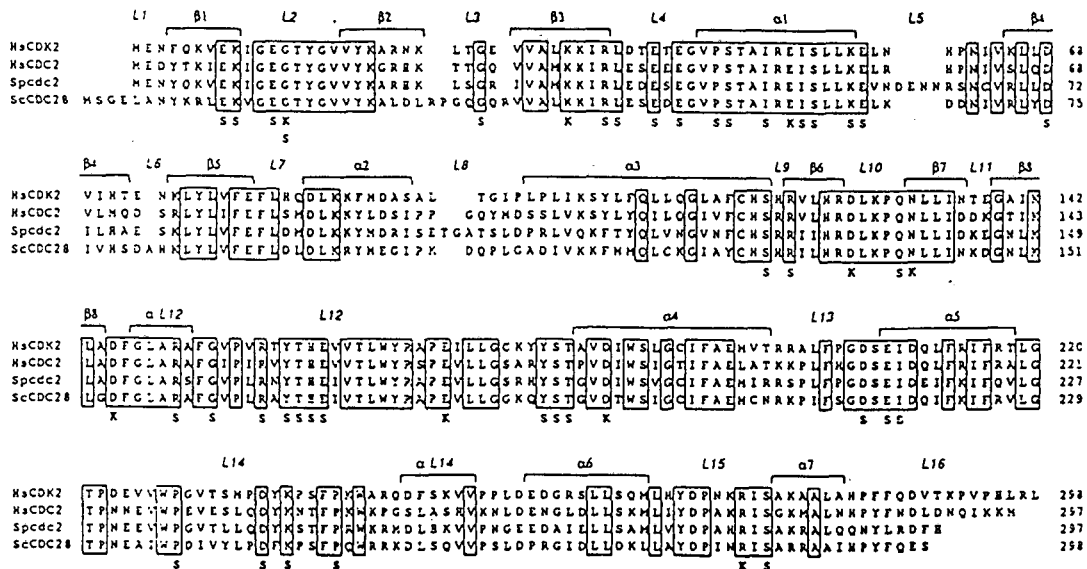


Fig.3. Seqüències de la cdk2 i cdc2 humana i de llevat.

Hi ha 140 residus d'aminoàcids conservats entre les quatre cdks comparades (indicat amb capses). Les regions conservades inclouen un *loop* de glicina on té lloc la unió a l'ATP, el motiu PSTAIRE i el motiu GDSEID. El llocs que no presenten homologia es troben en àrees distants del centre actiu de l'enzim. La S ens indica els llocs potencials d'unió a altres proteïnes i les K ens assenyalen els residus comuns a quasi totes les proteïna quinases.

L'esquelet de les cdks està definit per dos lòbuls, un lòbul petit compost per la regió aminoterminal, i un de gran que correspon a l'extrem carboxiterminal. L'ATP s'uneix a la proteïna en el sot que hi ha entre els dos lòbuls de manera que l'adenina es situa en la regió hidrofòbica (més interna) i els fosfats s'orienten cap a fora. Segurament, el lloc d'unió del substrat és també aquest. S'ha localitzat dos llocs d'associació de les proteïnes inhibidores (CKIs) a les cdks en el lòbul N-terminal i quatre en el lòbul C-terminal.

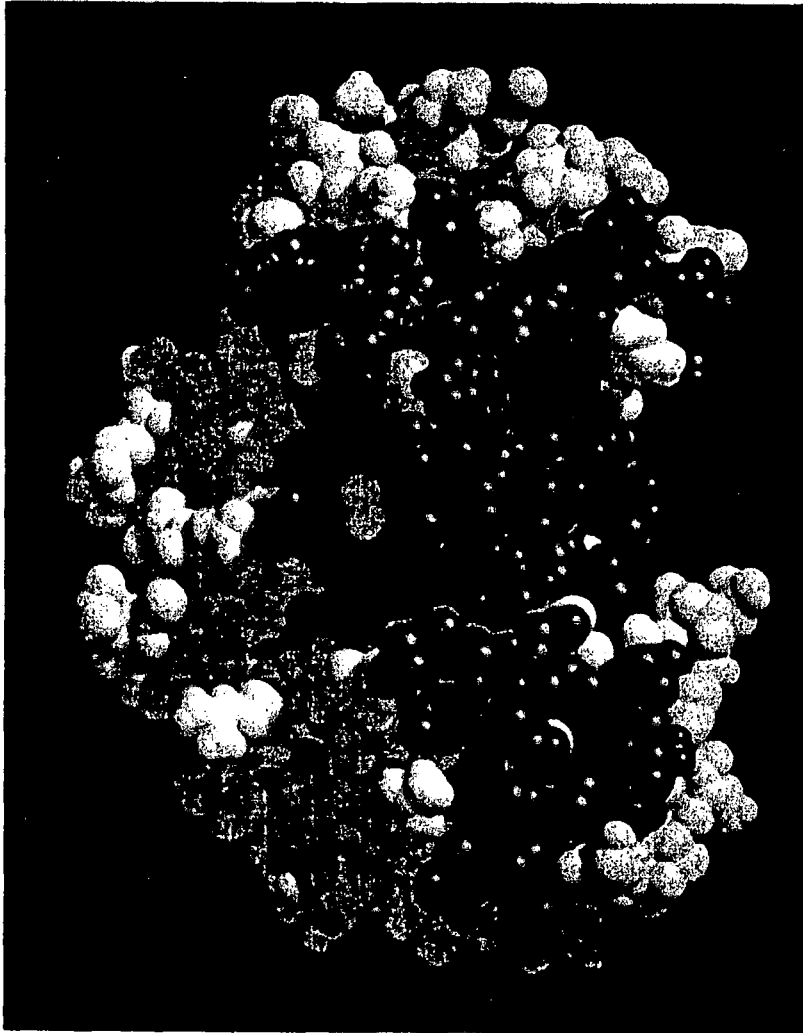


Fig 4. Model espacial de la cdk2 humana. El color rosa ens indica els residus conservats a les seqüències de les diferents cdks, el blau ens assenyala la molècula d'ATP i el vermell el lloc concret implicat amb la unió a les ciclins (DeBondt, et al., 1993).

2.2 Regulació de l'activitat de les cdks.

Els nivells cel.lulars de cdks romanen en excés durant el cicle cel.lular i la regulació de la seva activitat és un procés posttraduccional. La vida mitja de les cdks sol ser llarga (per exemple de 4 hores per la cdk4). L'associació a les seves subunitats reguladores o ciclines, reaccions reversibles de fosforilació i la unió a proteïnes inhibidores (CKIs) controlen aquesta activitat.

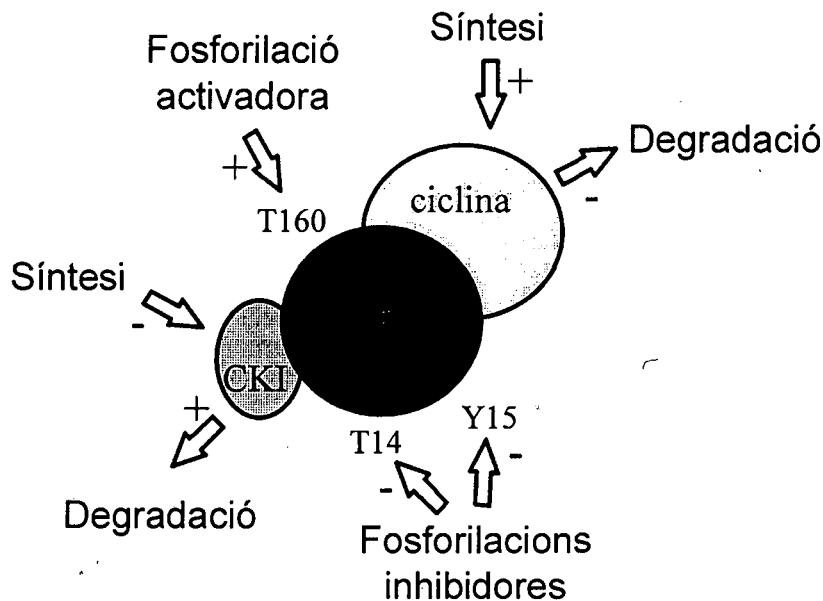


Fig 5. Nivells de regulació de l'activitat de les cdks.

2.2.1 Activació de les cdks per unió a les ciclines.

Estructura de les ciclines.

Les ciclines són una família de proteïnes (fins ara de la A a la I) relacionades estructuralment que s'uneixen i activen les subunitats catalítiques de les cdks. Un domini d'uns 100 aminoàcids molt conservat (30-50 % similitud entre les ciclines A, B, D i E) anomenat *cyclin box* és el responsable de la unió i de l'activació de les cdks (Jeffrey, et al., 1995). La unió de la ciclina a la cdk provoca un canvi conformacional a la regió PSTAIRE que es tradueix en l'aparició d'una activitat quinasa basal i és la responsable de l'especificitat pel substrat del complex.

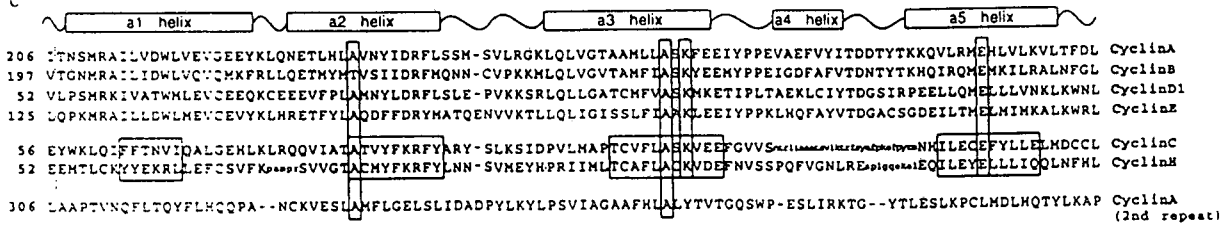


Fig 6. Seqüència de les ciclines A,B,D1,E,C i H. Les capses horitzontals en indiquen les *cyclin box*.

La funció de les ciclines està controlada primerament per canvis en els seus nivells d'expressió durant el cicle cel·lular. Cadascuna de les ciclines s'expressa en moments diferents del cicle el que determina l'activació de la cdk a la qual s'associa. A la modulació transcripcional de les ciclines s'hi afegeix el control en els nivells de proteïna. Les ciclines són degradades proteolíticament via ubiquitina (Glutzer, et al., 1991 i Murray, 1995). Es poden distingir dos tipus de ciclines: les que són constitutivament inestables i els seus nivells depenen dels nivells de transcripció, i les que només són inestables en una etapa concreta del cicle. Entre les primeres trobem les ciclines del G1 (Ds i E) de vida mitja curta (uns 30 minuts), que tenen en comú les anomenades seqüències PEST (Rogers, et al., 1986) que podrien definir aquesta característica, encara que les bases moleculars no es coneixen. Les ciclines de G2 i mitòtiques (A i B) són estables durant la interfase i es destrueixen durant la mitosi. Aquesta proteòlisis és dependent d'un motiu conservat de 40-50 residus localitzat a l'extrem N-terminal anomenat *destruction box* que és lleugerament diferent d'una ciclina a l'altre (Klotzbucher, et al. 1996). A més les ciclines A i B2 necessiten unir-se a la seva cdk per poder ser degradades. Quan una ciclina mitòtica no és degradada, com és el cas de la ciclina B1 quan els cromosomes no estan correctament alineats

durant la metafase, el cicle s'atura; en canvi quan una ciclina de G1 no es degrada la fase G1 no s'atura, sinó que s'escurça i avança més ràpidament cap a la fase S.

Funció dels complexos cdk/Ciclins.

Cdk	Organisme	Ciclina associada	Fase del cicle cel.lular
CDC28	<i>S. cerevisiae</i>	Cln (1-3), Clb (1-6)	Totes
cdc2	<i>S. pombe</i>	cdc13, cig 1 i 2	Totes
cdk1 o cdc2	animal	A, B1, B2 i B3	G2 i M
cdk4	animal	D1, D2 i D3	G1
cdk2	animal	A, i E	G1 i S
cdk3	animal	?	?
cdk4	animal	D1, D2 i D3	G1
cdk5	animal	p35	?
cdk6	animal	D1, D2 i D3	G1
cdk7 (CAK)	animal	H	Totes
cdk8	animal	C	G1?

Taula 1. Complexes cdk-ciclina.

Cdk4, cdk6 i les ciclins D: control del G1 i G1/S. E2F i les proteïnes *pocket* (pRb, p130 i p107).

Les quinases cdk4 (Matsushime, et al., 1992) i cdk6 (Meyerson and Harlow, 1994) formen una subfamília dins de les cdk. S'associen a les ciclins D1, D2, i D3 (Lew, et al., 1991; Motokura, et al., 1992., Xiong, et al., 1992., Inaba, et al., 1992) les quals actuen com a subunitat reguladora. Les dues són les primeres cdk en ser activades després de l'estimulació per factors de creixement. La seva activitat és la primera en detectar-se, coincideix amb la primera ona de fosforilació de la proteïna retinoblastoma (pRb), i presenten especificitat de substrat amb preferència per pRb en front de la histona H1.

Les ciclins D actuen com a sensors dels senyals disparats pels factors de creixement. L'activació transcripcional i l'expressió de les ciclins D és induïble per aquests factors (Matsushime, et al., 1991), i l'absència de factors de creixement provoca la seva ràpida degradació. La síntesis de les ciclins D comença a la transició

de G0/G1 i a diferència de les altres ciclines els nivells de la proteïna romanen constants durant tot el cicle sempre que hi hagi disponibilitat de factors de creixement (Matsushime, et al., 1994). Les ciclines D són molt inestables (30 minuts vida mitja) i la degradació es produeix via ubiquitina per acció dels proteasomes. La fosforilació de la ciclina en un dels seus residus (Thr-286) deguda a una quinasa encara desconeguda regula positivament la seva degradació (Diehl, et al. 1997). L'activitat quinasa associada a les ciclines D es detecta per primera vegada a mig G1, arriba a un màxim en el llindar G1/S i roman elevada en cèl.lules proliferants (Matsushime, et al., 1994).

L'expressió de les ciclines D1, D2 i D3 varia d'un teixit a l'altre, encara que sembla ser que no són redundants (Ando, et al., 1993., Tam, et al., 1994.). Una evidència d'aquest fet és que en cèl.lules epitelials de mama s'ha trobat activitat ciclina D2 associada a cdk2 a més de l'associada als complexos ciclina D1-cdk4/6 ja descrita (Sweeney et al. 1997). Cal dir que el gen de la ciclina D (PRAD1) es troba sobreexpressat en molts tumors i es defineix com a oncogen (Peters, 1994).

L'activitat quinasa associada a les ciclines D és essencial per a la regulació de les anomenades proteïnes *pocket* que inclouen Retinoblastoma (pRb) (Resnitzky, 1997), p130 (Mayol, et al., 1993) i p107 (Ewen, et al., 1991). Aquestes proteïnes s'uneixen i regulen negativament els factors de transcripció de la família E2F que són necessaris per a l'activació de la transcripció de gens claus per a la transició G1-S i d'altres (Lam and La Thangue, 1994., Degregory, et al., 1995). Entre ells han estat descrits: B-myb (Lam, and Watson, 1993); myc (Hiebert, et al., 1989); ciclina D1 (Herber, et a., 1994); ciclina E (Geng, et a., 1996); ciclina A (Schulze, et al., 1995); HsOrc1 (Ohtani, et al., 1996); dihidrofolat reductasa (Blake, and Azizkhan, 1989); PCNA (Yamaguchi, et al., 1995); DNA polimerasa α (Pearson, et al., 1991); cdc2 (Dalton, 1992; Tommasi and Pfeifer., 1995); i els propis E2F-1 i E2F-2 (Smith, et al., 1996). La família E2F inclou cinc proteïnes de la 1 a la 5 que formen heterodímers amb les proteïnes DP-1, 2 i 3. Les proteïnes *pocket* inhibeixen l'activitat transcripcional de les E2F mitjançant associació directe. La fosforilació de les *pocket* deguda a les cdk-ciclines allibera E2F i s'activa la transcripció dependent d'aquests factors. També en alguns casos el complex pRb-E2F pot actuar directament sobre el DNA inhibint la transcripció de determinats gens (Weintraub, et al., 1992).

Sembla ser que els diferents membres de la família d'E2F s'activen seqüencialment i s'associen específicament a una o altra proteïna *pocket* (revisat a Mayol and Graña, 1997). A més, l'expressió dels diferents E2F, de p130 i de p107 està també regulada durant el cicle. Els nivells de proteïna pRb no varien encara que s'ha vist un increment en certs models coincident amb la sortida del cicle i la diferenciació. Així, E2F-4 s'expressa a quiescència i durant el cicle mentre que E2F-1, 2 i 3 només es detecten a partir de mig de G1. Els complexos p130-E2F-4 es troben durant el G0 / principis G1 i sembla ser que també inactiven la transcripció de E2F-1. A mig G1 els complexos cdk-ciclina fosforilen la p130, la qual s'inactiva, allibera E2F-4 i els seus nivells decauen (Mayol, et al., 1995). Aquest fet es seguit per la síntesis de E2F-1 i de p107. En aquest estadi pRb hipofosforilat s'associa a E2F-1, 3 i 4 i p107 ho fa només a E2F-4. A finals del G1 pRb i p107 són hiperfosforilats per les cdk-ciclina, s'inactiven i els factors E2F alliberats activen la transcripció de gens essencials per la fase S. Cal afegir que pRb roman hiperfosforilat fins a finals de la mitosi. (Hollingswoth, et al., 1993). S'ha trobat que pRb hipofosforilat està associat a la matriu nuclear durant G1 primerenca (Mancini, et al., 1993). Curiosament, pRb és l'únic membre d'aquesta família que s'ha trobat inactivat en càncer, i les cèl.lules pRb negatives no necessiten de l'activitat ciclina D-cdk4 per proliferar (revisat a Serrano, 1997).

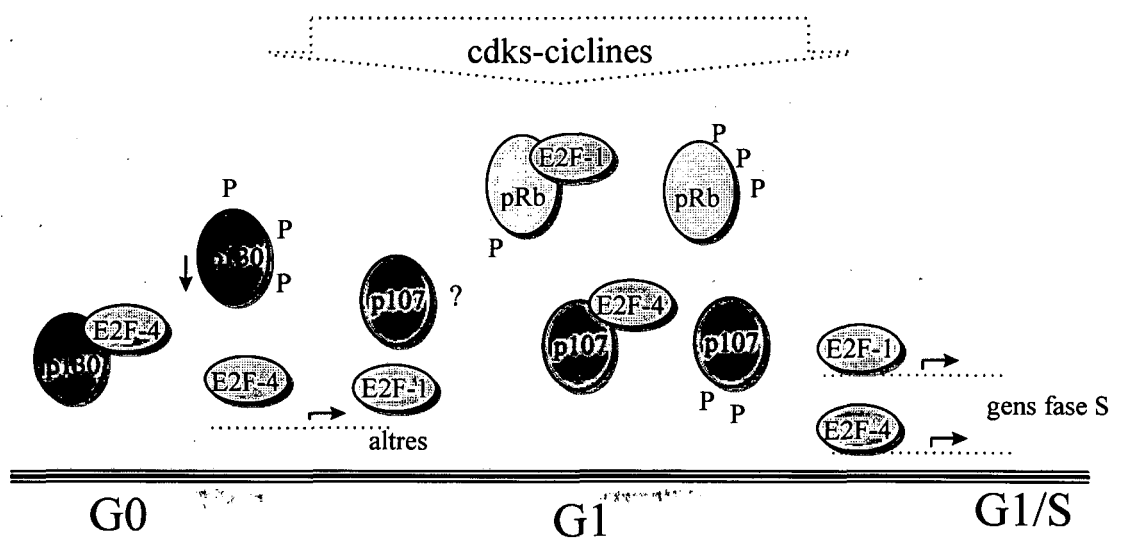


Fig 7. Mecanismes d'actuació de les proteïnes *pocket*.

Membres de la família de les fosfatases tipus I (PP1) són els responsables de la defosforilació de pRb (Alberts, 1993). L'activitat PP1 està controlada negativament per fosforilació deguda als complexos ciclina-cdk, i per tant, la caiguda de l'activitat quinasa a finals de la mitosi pot ser la responsable de l'activació de PP1 i de la defosforilació de pRb.

pRb presenta 16 llocs consens de fosforilació per les quinases de la família de les cdk, i aquests llocs es fosforilen al finals de G1 i començaments de la fase S. Per tant les cdk actives en aquest període de temps, ciclina D-cdk4/6 i ciclina E/cdk2, han de ser les responsables de la fosforilació. Encara no està clar si la fosforilació deguda a cada un d'aquests complexos és o no equivalent (Zarkowska and Mitnacht, 1997; Connell, et al., 1997). *In vitro* l'activitat cdk4-ciclina D i cdk2-ciclina E fosforilen diferents llocs de pRb, però ninguna de les dues per si sola pot completar tots els llocs fosforilats que s'observen *in vivo*. Aquestes observacions duen a postular tres teories: la primera és que les dues quinases puguin inactivar pRb completament encara que fosforilant-lo en llocs diferents; la segona possibilitat és que la fosforilació diferencial tingui efectes diferents en la regulació de les proteïnes que uneixen pRb (Knudsen, et al., 1996); i la tercera és que sigui necessària la fosforilació combinada de les dues quinases per inactivar pRb.

Tot i això existeix certa controvèrsia en la participació de ciclina E-cdk2 en aquest mecanisme, com veurem a l'apartat següent en el qual es suggereix que l'activitat ciclina E-cdk2 pot provocar la progressió cap a la fase S independentment de l'activació de pRb. Es postula també que les ciclins E i A podrien participar en la regulació de fets *downstream* a pRb degut a que la seva expressió sembla estar sota el control d' E2F (Geng, et al., 1996., Schulze, et al., 1995).

pRb sembla ser també la proteïna que lliga la senyal mitogènica disparada per l'oncogen ras i la progressió del cicle en la fase G1. La inactivació de ras provoca una disminució dels nivells de ciclina D1, un cúmul de la forma hipofosforilada de pRb i l'atur del cicle en G1. Si pRb s'elimina de les cèl.lules, aquestes perden la capacitat de respondre amb l'atur del cicle en G1 com a conseqüència de la inactivació de ras (Peeper, et al., 1997).

pRb inhibeix també l'expressió de gens transcrits per les RNA polimerases I (rRNA) i III (petits RNAs i RNAt) a part dels transcrits per la RNA polimerasa II (via E2F i altres factors de transcripció) (Cavanaugh, et al., 1995., White, et al., 1996)). Per tant pRb sembla també tenir un paper important en la regulació de la biosíntesi general de proteïnes durant el G1 necessàries pel creixement de la cèl.lula.

Oncoproteïnes com l'antigen T del virus SV40, E1A d'adenovirus i E7 de papilomavirus també s'uneixen a Rb afavorint l'alliberament de E2F (revisat a Hollingsworth, et al., 1993).

Cdk2 i ciclina E: Control de G1/S.

L'activitat quinasa deguda a la cdk2 apareix a partir de mig G1 associada a la ciclina E. Els nivells de mRNA i de proteïna de ciclina E assoleixen un màxim a la G1 tardana i decauen a S on la cdk2 s'associa a la ciclina A (Dulic, et al., 1992; Koff, et al., 1992). La vida mitja de la ciclina E és de 30 minuts i la fosforilació en un residu de treonina (Thr-380) degut a la pròpia cdk2 determina la seva ubiquïtinització i degradació (Clurman, et al., 1996). La sobreexpressió de ciclina E es tradueix en un escurçament de G1 i en una disminució dels requeriments de factors de creixement (Ohtsubo and Roberts, 1993; Wimmel, et al., 1994). El tractament de les cèl.lules amb TGF β inhibeix l'activitat quinasa associada a cdk2-ciclina E (Koff, et al., 1993).

Estudis recents indiquen que la regulació de la transició G1/S és més complex que el que es pensava fins ara. Possiblement les ciclines D i la E no actuen de manera seqüencial i depenent. Sembla ser que la sobreexpressió de la ciclina E, al contrari que la sobreexpressió de cíclica D, permet superar l'arrest en G1 en cèl.lules que expressen un mutant no fosforilat de pRb o en cèl.lules amb un mutant dominant negatiu de DP-1 (cooperant d'E2F).

Una altre funció associada a l'activitat quinasa lligada a la ciclina E és la fosforilació de l'inhibidor p27 pel seu reconeixement i posterior destrucció via ubiquïtinització /proteàsoma (Sheaff, et al., 1997).

Cdk2 i ciclina E i cdk2 i ciclina A: Control de la fase S.

Els mecanismes responsables de la regulació de la fase S encara no es coneixen amb certesa. Hi ha dos estats que cal assolir pel correcte funcionament del cicle cel.lular: un estat competent per l'inici de la replicació del DNA i un correcte alineament dels cromosomes a la metafase durant la mitosis. Aquest dos estats no poden mai tenir lloc al mateix temps. Així l'estat competent per a la duplicació del DNA no es pot assolir quan els factors necessaris per la metafase estan actius i a l'inrevés. Es postula que un control anomenat de la re-replicació assegura que una determinada seqüència de DNA es repliqui només una vegada per cicle cel.lular, i que un tipus de control S/M determina l'alternància de fases S i de mitosis.

La replicació del DNA comença quan unes proteïnes específiques s'uneixen a unes seqüències de DNA anomenades orígens de replicació (DePamphilis, 1993). Els orígens de replicació (OBR) de *Saccharomyces cerevisiae* són els més coneguts. Es tracta de les anomenades seqüències ARS (*autonomously replicating sequences*). Estan compostats per un element central anomenat *core* i altres components auxiliars (18 pb - 1000 pb). El *core* és la mínima seqüència necessària per a iniciar la replicació del DNA. Els orígens de replicació dels mamífers no s'han identificat, però se sap que són seqüències específiques de 0.5 a 5 kb amb una zona complementària de 6 a 55 kb i es pensa que funcionen d'una manera similar als del llevats. Cal assenyalar que tant els orígens de replicació com els enzims replicatius estan associats a la matriu nuclear.

En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* un complex anomenat ORC (complex de reconeixement de l'origen) compost per 6 polipèptids de 50 a 120 kDa, està unit a les seqüències ARS durant tot el cicle cel.lular. ORC juga un paper essencial en la iniciació de la replicació i s'han caracteritzat els homòlegs d'ORC en altres eucariotes (Micklem, et al., 1993., Gavin, et al., 1995).

En relació amb aquesta evidència, es pensa que existeixen dos tipus de complexos associats a la cromatina (revisat a Chevalier and Blow, 1996):

- els de pre-replicació, que contenen ORC més altres proteïnes, i coincideixen amb l'estat de competència per a la síntesis del DNA; en *S. cerevisiae* s'estableixen després de la separació de les cromàtides germanes durant l'anafase, i es mantenen

durant el G1. La replicació en aquest estadi no té lloc perquè manca l'activador de la fase S.

- els complexos post-replicatius que es formen per trencament dels complexos pre-replicatius una vegada s'activa la fase S.

S'han descobert diverses proteïnes que poden estar relacionades amb aquests dos tipus de complexos:

Cdc18 (*S. pombe*) /CDC6 (*S. cerevisiae*) són proteïnes amb molta homologia amb la subunitat gran d' ORC i la seva presència és essencial per a iniciar la replicació del DNA. Se les relaciona amb la formació del complex pre-replicatiu a finals de la mitosis o començament del G1 i forma part del mecanisme que assegura que la replicació del DNA tingui lloc abans de la mitosis. Membres d'aquesta família també han estat identificats en *Xenopus* i humans.

Dbf4 i cdc7 formen un complex amb activitat quinasa, necessari per a la iniciació de la replicació en *S. cerevisiae*. El pic d'activitat es localitza a la transició G1/S.

La família de les MCM (*minichromosome maintenance*) (revisat a Stillman, 1996) comprèn 5 proteïnes MCM2, MCM3, CDC46/MCM5, CDC54/MCM4 i CDC47/MCM7 que són també necessàries per a la iniciació de la replicació. S'associen a la cromatina a finals de la mitosis, continuen associades a ella durant G1 i són alliberades gradualment durant la fase S. En *Saccharomyces cerevisiae* les proteïnes MCM5 interaccionen amb una subunitat de ORC (ORC6). Mutacions *mcm* provoquen l'arrest del cicle al llindar G1/S. Recentment, a mamífers, ha estat descoberta la família de les proteïnes P1 (Hu, et al., 1993) que s'associen a la DNA pol α i són molt semblants a nivell de seqüència amb les MCM3, 2 i 5 de *S. cerevisiae* i a la CDC21 de *S. pombe*.

Les proteïnes MCM s'han relacionat amb la teoria de l'anomenat factor llicenciador (Leno, et al., 1992) que asseguraria que una re-replicació del DNA no tingui lloc. Aquesta teoria postula que una proteïna que s'uneix al DNA, necessària per a l'inici de la replicació tindria accés a la cromatina només durant la mitosis quan la membrana nuclear es trenca, o bé, quan és permeable. Durant la interfase, quan el nucli està intacte, el factor llicenciador no seria capaç de fer-ho. La unió del factor a la

cromatina la faria competent per a la replicació, però una vegada el DNA s'hauria replicat el factor seria eliminat per tal d'evitar una nova replicació. Només els orígens no replicats mantindrien unit aquest factor llicenciador actiu i seria necessària una altre mitosis per tal que el factor llicenciador fos accessible de nou al DNA.

S'ha creat un model que relaciona la teoria del factor llicenciador amb les evidències experimentals obtingudes fins el moment :

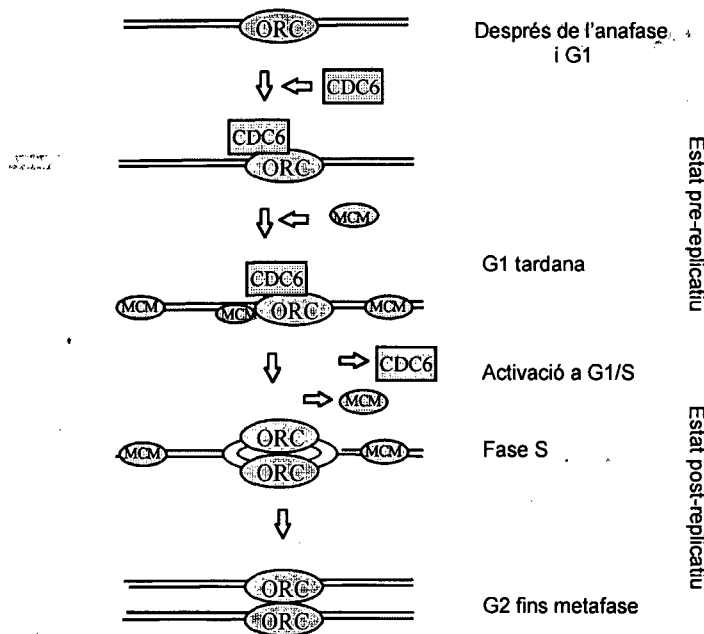


Fig 8. Model de la replicació i teoria del factor llicenciador (Stillman, 1996).

Evidències experimentals assenyalen que les cdk2 són necessàries per a la iniciació (cdk2-ciclina E) i per a la progressió (cdk2-ciclina A) de la replicació. La síntesis de la ciclina A comença una mica abans de la transició G1/S, però l'activitat cdk2-ciclina A es presenta més tard i coincideix amb el moment en que es pot detectar per primer cop síntesis del DNA. La degradació de la ciclina A es produeix durant la mitosi (Pines, and Hunter, 1990; Girard, 1991; Pagano, et al., 1992;).

Així, la cdk2 seria responsable de dos fets essencials: primer d'engegar la replicació via fosforilació i activació de proteïnes necessàries per a iniciar la síntesis del DNA en els orígens competents (procés que en anglès rep el nom de *firing*); i

segon fosforilar certs factors que passarien d'un estat de preiniciació de la síntesi de DNA a un estat de postiniciació del qual seria impossible tornar enrera i serien en part responsables d'evitar la re-replicació del DNA.

Existeixen algunes evidències experimentals que recolzen aquesta teoria. Els nivells de proteïna i l'activitat *in vivo* de *cdc18* incrementen amb la presència de l'inhibidor de *cdks* Rum 1, el que indica que les *cdks* directa o indirectament inhibeixen la funció de *cdc18* en la replicació del DNA (Jallepalli and Pelly, 1996). A més *cdc18* i *CDC6* contenen possibles llocs de fosforilació per les *cdks*. La proteïna *P1MCM3* també presenta canvis en els seus nivells de fosforilació (Hu, et al., 1993). La forma poc fosforilada és l'associada a la cromatina durant la interfase, primer es dissocia de l'eucromatina i després de l'heterocromatina per hiperfosforilació a mesura que s'avança en la replicació.

La proteïna *Orp2* de *S. pombe* (homòleg d'*ORC2* de *S. cerevisiae*) interacciona amb la *cdc2* i la *cdc18* (Leatherwood, et al., 1996) i presenta llocs de fosforilació per *cdc2*, el que fa pensar que les *cdks* podrien formar part dels complexos d'iniciació de la replicació i fosforilar les proteïnes *ORC*. La ciclina A i la *cdk2* colocalitzen amb els llocs de replicació en nuclis en fase S (Cardoso et al., 1993) i copurifiquen amb els complexos replitasa en cèl.lules HeLa (Jaumot et al., 1994). Les *cdks* fosforilen i activen *in vitro* la proteïna vírica de polyomavirus iniciadora de la replicació anomenada Antigen T (Li, et al., 1997). També la proteïna *RP-A* (Fang, 1993) es troba fosforilada al començament de la fase S una vegada s'ha unit al DNA i és substrat de *cdk2 in vitro*. La DNA polimerasa α ha estat també proposada com a substrat de les *cdks in vitro* (Voitenleitner, et al., 1997)

Els complexos d'iniciació actius provoquen l'obertura de la fibra de DNA on les DNA helicases despleguen la doble hèlix i generen zones de cadena senzilla. Seguidament, la proteïna de replicació A (*RP-A*) s'uneix al DNA de cadena senzilla i actua com a lloc d'ancoratge de la DNA polimerasa /primasa i comença la replicació.

També sembla que l'activitat *cdk* és necessària per a la transcripció de gens de fase S. Per exemple a *S. cerevisiae* la proteïna *SWI6* (Sidorova and Breeden, 1993) que forma part del factor que regula la transcripció de gens de fase S a la transició G1-S conté llocs potencials de fosforilació per *CDC28* (*cdc2*).

La ciclina A també s'uneix a E2F1/DP-1 i l'activitat quinasa que duu associada fosforila DP-1 amb la qual cosa E2F perd la propietat de unió al DNA (Dynlacht, et al., 1994).

Les factories de replicació i la matriu nuclear.

La síntesis del DNA té lloc en unes macroestructures nuclears discretes associades al nucleoesquelet anomenades factories de replicació. Cada factoria conté al voltant de 40 forquilles de replicació més les DNA polimerases associades. El DNA que s'està sintetitzant és la molècula que es mou, i els enzims replicatius estan fixats en aquestes estructures.

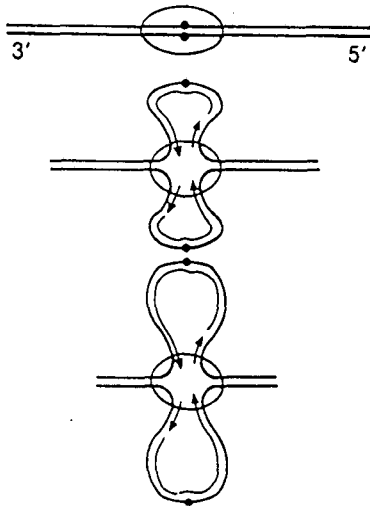


Fig 9. Model de Hozák and Cook, 1994.

Existeixen diferents aproximacions per aïllar bioquímicament i/o observar microscòpicament les factories de replicació. Aquests mètodes són molt diferents i estan més o menys recolzats, però a la fi tots arriben a conclusions equivalents. En aquest apartat farem un repàs d'aquestes metodologies:

Sembla ser que el procediment que conserva més fidelment les condicions fisiològiques és el proposat per Hozák et al., 1993; que consisteix en encapsular les cèl·lules amb agarosa i després permeabilitzar-les amb detergent; les proteïnes

citoplasmàtiques i el RNA difonen cap a fora i només queda encapsulat el nucleoesquelet amb la cromatina i estructures associades. L'electroelució previ tractament amb endonucleases que elimina el 75% de la cromatina, no redueix l'activitat sintètica del DNA i tampoc allibera el DNA naixent de l'encapsulat, el que indica que les polimerases i la síntesis de DNA estan ancorats directe o indirectament al nucleoesquelet.

Utilitzant aquesta tècnica i d'altres (Nakayasu and Berezney, 1989; Cardoso, et al., 1993) es va aconseguir observar microscòpicament les factories de replicació a partir de l'incubació de cèl.lules sincronitzades en fase S amb anàlegs de precursors marcats de la síntesi del DNA. Aquest llocs (*foci*) discrets contenen cadascun varies forquilles de replicació, i al menys la DNA polimerasa α i el PCNA (Hozák, et al., 1993). Amb microscopia confocal es va demostrar la colocalització de la cdk2, la ciclina A, i la subunitat de 70 kDa del RPA amb les factories de replicació (Cardoso, et al., 1993). Els estudis amb microscopia electrònica confirmen la presència del PCNA en les factories de replicació, però no la presència de la DNA polimerasa α , segurament per problemes tècnics de marcatge (Hozák, et al., 1993).

Altres aproximacions a aquesta evidència van estar realitzades per Berezney a partir d'experiments realitzats amb la matriu nuclear. S'entén com a matriu nuclear l'estructura fibrogranular, heteromòrfica i tridimensional que conté: la làmina nuclear (amb els pors nuclears), components residuals dels nucleols, gran nombre de proteïnes associades (entre elles cal destacar proteïnes de unió al DNA com les lamines A i C i les matrines), i quantitats variables de DNA i RNA segons el tipus d'extracció. Un gran nombre de funcions nuclears (revisat a Berezney, 1991) estan relacionades amb la matriu. Cal destacar que els orígens de replicació, la síntesis del DNA, la DNA polimerasa α / primasa i altres factors replicatius estan associats a aquesta estructura. El mètode pioner d'aïllament de la matriu nuclear pertany a Berezney and Coffey (1974) i inclou el tractament dels nuclis aïllats amb nucleases i elevades concentracions de sals; l'estructura insoluble a aquest tractaments correspon a la matriu nuclear. A partir d'aquest mètode s'han fet variacions (revisat a Nickerson, et al., 1990; i a Berezney, 1991) i cal destacar les preparacions *in situ* de matrius nuclears per a l'observació al microscopi electrònic de Penman (Fey, et al., 1986).

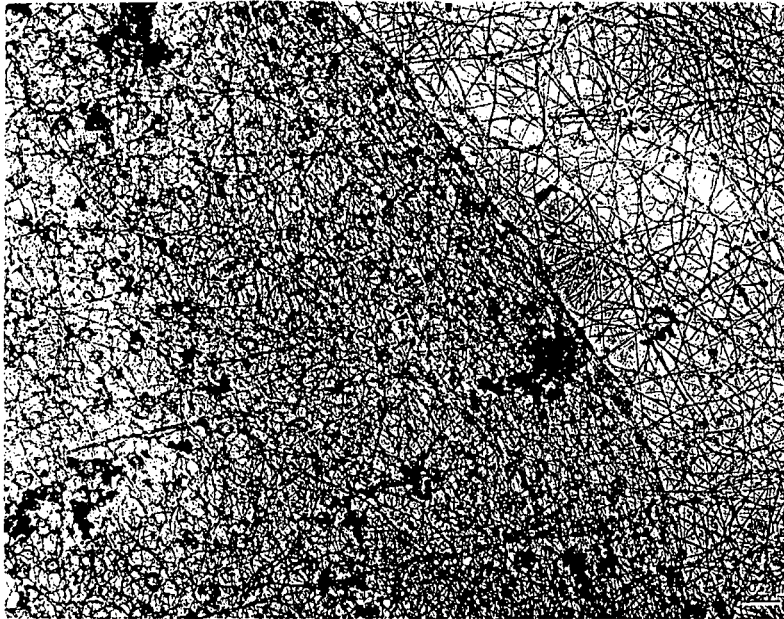


Fig 11. Preparació de matriu nuclear (Nickerson, et al., 1990).

Cdc2 i ciclina A: Control de G2.

Durant el G2, la ciclina A s'associa a cdc2. La seva funció està possiblement relacionada amb la reorganització del citoesquelet en preparació per a la mitosis.

Cdc2 i ciclina B: Control de la mitosi.

La ciclina B es sintetitza durant la fase S i roman en el citoplasma on s'associa a la cdc2. Els complexos cdc2-ciclina B entren en el nucli just abans de la mitosis i allà s'activen (Pines and Hunter., 1991; Gallant, and Nigg., 1992). Aquests complexos s'associen a l'estructura del fus mitòtic on segurament fosforilen proteïnes implicades en el seu correcte funcionament (Gallant, and Nigg., 1992; Ookata, et al, 1992). La destrucció de la ciclina B té lloc en el lliandar entre la metafase i l'anafase (Glotzer, et al., 1991; Hershko, et al., 1994). Han estat descrites tres ciclines B diferents, B1, B2 i B3. La ciclina B2 es localitza en l'aparell de Golgi quasi exclusivament, fet que la relaciona amb el desacoblament d'aquest orgànul durant la mitosi (Jackman, et al., 1995).

Durant la mitosi tenen lloc una sèrie de fets essencials on la quinasa cdc2 associada a la ciclina B hi juguen un paper destacat. Els més importants són la desorganització del nucli (trencament de l'embolcall i alliberament de la làmina nuclear), la generació del fus mitòtic, la condensació dels cromosomes, la reorganització del citoquesquelet d'actina-miosina, la disminució o trencament de certs orgànuls com el nucleol, i les inhibicions de la transcripció, traducció i tràfic dependent de membranes.

Fins ara el nombre més gran de substrats de cdks coneguts pertanyen a la cdc2 i són proteïnes la fosforilació de les quals contribueix a la reorganització de l'estructura i funcions cel·lulars durant aquesta fase (revisat a Nigg, 1993).

Proteïnes que s'associen a la cromatina com la Histona H1, les HMG (proteïnes de unió a la cromatina d'alta mobilitat) i alguns factors de transcripció veuen debilitada la seva unió amb el DNA degut a la fosforilació per cdc2 el que pot contribuir a la condensació de la cromatina que té lloc durant la mitosi. La caseïna quinasa II es fosforila per cdc2 fet que podria modular l'associació amb els seus substrats com per exemple la topoisomerasa II que participa tant a la condensació de la cromatina, com en la separació de les cromàtides germanes. La Caldesmon i la cadena lleugera de la miosina també són substrats de cdc2, fet que es relaciona amb la formació de l'anell contràctil durant la citocinesis. La fosforilació de la nucleolina i la NO38 participaria en la inhibició de les activitats nucleolars durant la mitosi. La fosforilació de certs factors de transcripció i de proteïnes dels complexos de transcripció provocarien la inhibició d'aquesta durant la mitosi. Les MAP són proteïnes que s'associen als microtúbuls fosforilables també per cdc2, la fosforilació provocaria també canvis en l'estabilitat del microtúbuls durant la mitosi. Cdc2 fosforila les proteïnes de la lamina nuclear provocant la desorganització de la mateixa necessària pel trencament de les membranes nuclears. També la vimentina i proteïnes dels neurofilaments es fosforilen encara que el sentit d'aquest fet no està gens clar. La fosforilació de les quinases p60^{src} i p150^{abl} per cdc2 es relaciona amb la reorganització del citoesquelet durant la mitosi. La fosfatasa cdc25 i la SWI5 també són substrats de cdc2.

Cal anomenar una altra quinasa que participa activament en la fase de mitosi, la *Polo-like* quinasa (Golsteyn, et al 1994), que està fortament relacionada amb la

formació del fus mitòtic i la segregació dels cromosomes; i la seva expressió s'ha vist incrementada en diferents tumor humans.

Cdk5 i p35

La cdk5 és un heterodímer format per la subunitat catalítica de 33 kDa (cdk5) (Kobayashi, 1993) i la subunitat reguladora de 25 kDa. La subunitat reguladora és el producte de la proteolisis d'una proteïna de 35 kDa (Lew, 1995) que actua com una ciclina, però només presenta un 8 % d'identitat amb la *cyclin box*. Una altre proteïna de 67 kDa copurifica amb cdk5 i és essencial per a l'activitat quinasa de la cdk.

La cdk5 va ser aïllada de cervell de mamífer i és molt abundant a cèl.lules neuronals. A diferència de les altres cdks conegudes, no se li ha associat cap funció reguladora dins el cicle cel.lular i es relaciona amb la dinàmica i organització del citoesquelet. Es creu que és la responsable de les fosforilacions de les proteïnes que formen els neurofilaments i de les proteïnes Tau. Cal dir que s'han trobat fosforilacions anormals de proteïnes Tau associades a la malaltia D'Alzheimer (Baumann, et la., 1993).

cdk3

L'expressió de mutants cdk3 provoca l'atur del cicle en G1 i per tant es pensa que participa en la regulació del cicle cel.lular (Meyerson, et al., 1992; Van den Heuvel and Harlow, 1993). Cdk3 s'associa *in vivo* a E2F-1/DP-1 i col.labora en l'activació d'E2F-1,2 i 3 (Hofmann and Livingston, 1996).

Cdk8-ciclina C

La cdk8 (Tassan, et al., 1995) associada a la ciclina C (Lew, et al., 1991) es relacionen amb la transcripció.

Altres cdks i ciclins.

Han estat identificades altres proteïnes de mamífer relacionades amb la cdc2 (el nom que se'ls hi ha posat correspon al domini homòleg al PSTAIRE conservat a totes les cdks) encara que la seva funció en el cicle cel·lular no s'ha demostrat fins el moment: PITSLRE, PCTAIRE, PITAIRE, PITALRE, i PISSLRE (revisat a Graña i Reddy, 1995).

De les següents ciclins no se sap res en relació a la seva funció ni tampoc es coneix la cdk a la qual s'associen: Els nivells de ciclina F fluctuen durant el cicle i presenten un pic d'expressió durant el G2; presenta la típica seqüència PEST de les ciclins del G1 (Bai, et al., 1994). L'expressió de la ciclina G (Tamura, et al., 1993) depèn de p53, el que fa pensar en la seva possible participació en els mecanismes de vigilància (*checkpoints*) (Okamoto and Beach, 1994). Els nivells de la ciclina I no estan regulats durant el cicle i possiblement no participa en la seva regulació (Nakamura, et al., 1995).

2.2.2 Activació i inhibició de les cdks per fosforilació.

Fosforilació de la threonina 160/161. CDK7 (CAK)/ Ciclina H .

L'activació de les cdks també està regulada per la fosforilació d'un residu conservat de treonina (Thr 161 a la cdc2 humana o la Thr 160 a la cdk2). De igual manera la defosforilació d'aquest residu pot inactivar la cdk, però la transcendència d'aquest fet *in vivo* encara no és gaire clara.

La cdk7 (en un principi anomenada CAK de *cdk activating kinase*) és la quinasa responsable de la fosforilació de la Thr 160-161 (Solomon, et al., 1992). La subunitat catalítica de la cdk7 és la ciclina H (Fisher and Morgan, 1994). Amb els complexos cdk7-ciclina H copurifica una altre proteïna anomenada MAT1 la funció de la qual es postula que podria ser la de factor d'acoblament (Devault, et al., 1995). L'activitat cdk7 no varia durant el cicle, i només es veu reduïda durant la quiescència. Una mutació en un lloc potencial de fosforilació (thr 170 en la cdk7 humana) redueix la seva activitat el que fa sospitar també una regulació negativa a aquest nivell. L'accés de cdk7 a la Thr 160 es veu afavorida pel canvi conformacional que succeeix

a la cdk com a conseqüència de la prèvia unió a la ciclina. Així mateix, la fosforilació en aquest residu ajuda a la unió del substrat al lloc catalític de l'enzim (revisat a Sclafani, 1996).

CAK també fosforila la RNA polimerasa II i forma part del factor de transcripció TFIIF que s'associa a aquesta polimerasa, fet que fa pensar a més en un possible paper de la cdk7 en el procés de la transcripció (Feaver, et al., 1994).

La defosforilació de la Thr160-161 pot ser catalitzada per la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) o per la fosfatasa associada a cdk (KAP), encara que aquets fet només s'ha demostrat *in vitro* (Poon and Hunter, 1995).

Fosforilació de la Threonina 14 i la Tyrosina 15. WEE1 i CDC25.

La fosforilació de les cdks en els llocs corresponents a la Thr14 i Tyr 15 (cdc2 i cdk2 humanes) té una funció inhibidora. En el llevat, la quinasa responsable de la fosforilació de la Tyr 15 és l'anomenada Wee1 (a *S. pombe* també la Mik1). La fosforilació de la Thr 14 és exclusiva d'eucariotes superiors (Kornbluth, et al., 1994).

Les fosfatases CDC25 són les responsables de la defosforilació de la Thr14 i la Tyr 15 i per tant de l'activació de les cdks (només demostrat per a la cdk2 i la cdc2). CDC25A s'expressa a G1 tardana i CDC25B i C ho fan més a prop de la mitosis. La seva regulació és a nivell transcripcional i post-traducciona per fosforilació (Hoffmann, et al., 1994).

En *Xenopus*, humans i els llevats de fissió els nivells de fosforilació de cdc25 són més elevats durant la mitosi, fet que es tradueix amb un increment de la seva activitat fosfatasa. Estudis realitzats amb wee1 demostren que també es troba hiperfosforilat durant la mitosi i en aquest cas la seva activitat quinasa es veu disminuïda. Sembla ser que la mateixa cdc2 podria fosforilar aquests enzims, el que respondria a un mecanisme de *feed-back* positiu; o bé altres quinases podrien fer-ho, com la cdk2 (segurament associada a la ciclina E) també requerida a *Xenopus* per a la hiperfosforilació de cdc25 i l'activació de cdc2 (Guadagno and Newport, 1996). Recentment, ha estat identificada una quinasa humana, la Chk1, que fosforila la serina 216 de cdc25 C i l'inactiva quan s'ha produït dany en DNA (Sanchez, et al., 1997).

Sembla ser que les fosforilacions de la Thr14 i Tyr 15 en els eucariotes superiors juga el mateix paper i seria un mecanisme de seguretat per que tant sols la fosfatasa cdc25 fos capaç de defosforilar-les (té activitat treonina/tirosina fosfatasa, mentre que les fosfatases més abundants a la cèl.lula són serina-treonina o tirosina fosfatases unicament).

La wee1 només és capaç de fosforilar la Tyr15; s'ha identificat una quinasa humana dual anomenada Myt1Hu (Liu, et al., 1997) que podria ser l'encarregada d'aquestes fosforilacions. Myt1 de *Xenopus* també s'hiperfosforila i inactiva durant la mitosi (Kornbluth, et al., 1994) com fa la wee1.

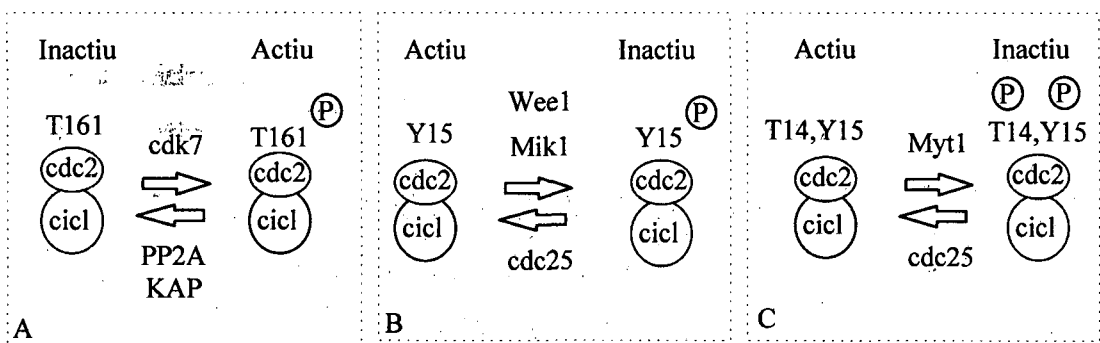


Fig 12. Regulació de la fosforilació de cdc2 .

2.2.3 Inhibició de les cdk's per unió a proteïnes inhibidores (CKIs).

Les CKIs són unes proteïnes de pes molecular petit que s'associen a les cdk's o als seus complexos i regulen negativament la seva activitat. A cèl.lules de mamífer s'han descobert fins ara varies CKIs les quals s'han agrupat en dues famílies.

La família CIP/KIP que inclou la p21, p27 i p57 presenten la regió aminoterminal conservada. L'associació de p21 amb les cdk's sempre es dona en presència de ciclins igual que p27, el que suggereix un mecanisme d'inhibició similar. Els dos inhibidors poden interactuar i inhibir la majoria dels complexos ciclins-cdk's. Es pensa que podrien bloquejar l'acció de CAK, però també s'ha vist que inhibeixen complexos ja fosforilats per aquesta via. La segona família d'inhibidors anomenada INK4 inclou la p15, p16, p18, i p19. A diferència de les CKIs

esmentades prèviament, s'associen específicament a cdk4 i cdk6 monomèriques i impedeixen la formació del complex cdk-ciclina i per tant l'activació de les quinases.

p21 (cip1, WAF1, Sdi1, CAP20, PIC1).

Els estudis sobre la p21 es van iniciar l'any 1993 (Gyuris et al., Gu et al. i Harper et al.). La primera funció atribuïda a la p21 va ser la de proteïna inhibidora del cicle cel.lular, però de fet, en aquest moment hi ha evidències experimentals que apunten al fet que p21 juga altres papers en el control de la proliferació, diferenciació i envelliment cel.lular.

La proteïna p21 s'ha trobat associada als complexos Cdk2-ciclina A/E, Cdk4-ciclina D(s) i a Cdc2-ciclina B en fibroblastes normals (Harper, et al., 1995). Els estudis més exhaustius dels complexos realitzats per Xiong, et al., (1993) i Zhang, et al., (1993) van evidenciar que les cdks i el PCNA són les proteïnes que majoritàriament es troben associades a p21 en fibroblastes humans normals (W138). Mitjançant immunoprecipitacions i fraccionaments en gradients de glicerol d'extractes marcats amb metionina-S³⁵ van demostrar l'existència de complexos quaternaris ciclina A-cdk2-p21-PCNA i de ciclina D-cdk4-p21-PCNA més possiblement una altre subunitat adicional de 105 kDa en cèl.lules normals. Contràriament, algunes línies transformades no presentaven PCNA i p21 acomplexats amb les cdks-ciclines.

Estudis funcionals *in vitro* demostren que p21 inhibeix fortament cdk2, cdk3, cdk4 i cdk6, però dèbilment cdc2-ciclina B i cdk5-p35 i no s'associa a cdk7-ciclina H (Harper, et al., 1995). A més, la sobreexpressió de p21 inhibeix la proliferació cel.lular (Xiong, et al., 1993).

S'han proposat diferents mecanismes d'inhibició per la p21. Primer de tot, encara que p21 és un inhibidor universal de totes les cdks *in vitro*, la inhibició només es produeix quan p21 assoleix uns nivells determinats en els complexos (cal més d'una subunitat de p21) es a dir, hi ha complexos que contenen p21 que són actius i d'altres d'inactius (Zhang et al. 1994). Els nivells elevats de p21 provoquen un bloqueig que impossibilita l'accés de la CAK a la subunitat catalítica de la cdk i per tant l'activació per fosforilació de la quinasa (Aprelikova, et al., 1995). També s'ha proposat que p21 inhibeix l'associació cdc25-ciclina-cdk2 i per tant la defosforilació

de cdk2 i conseqüent activació de la quinasa (Saha et al., 1997). P21 podria impedir també la interacció dels substrats amb els complexos cdk-ciclins (Adams et al. 1996).

Luo, et al., (1995) van descriure que els dominis d'inhibició de les cdk i de unió amb el PCNA són diferents dins la molècula de p21. El lloc de unió i de inhibició del PCNA es troba a l'extrem C-terminal de la proteïna, mentre que el lloc de inhibició de les cdk, a l'igual que la p27 i la p57 es localitza en un domini conservat de l'extrem N-terminal. A més les ciclins s'associen també a aquest domini N-terminal independentment de la unió de la cdk. Els dos llocs d'associació (a les cdk i a les ciclins) són necessaris per inhibir l'activitat quinasa dels complexos (Fotadar et al. 1996). Aquests fets suggereixen que p21 pot aturar el cicle cel·lular per dos mecanismes diferents: un inhibint les cdk de G1 impedit la transició de G1/S, i l'altre inhibint el PCNA i així interferint directament en la replicació del DNA. P21 bloqueja l'habilitat del PCNA d'activar la DNA polimerasa δ impossibilitant el seu moviment durant l'elongació de la cadena de DNA durant la replicació fet demostrat en el sistema de replicació *in vitro* del virus SV40. La participació del PCNA en el trencament de nucleòtids durant el procés de reparació del DNA sembla que també es veu afectada per p21 (Pan et al. 1995). El PCNA no afecta a la inhibició de l'activitat quinasa deguda a p21 ni tampoc interfereix en l'associació de p21 amb la forma activa de l'enzim.

El gen que codifica per a la p21 està regulat pel factor de transcripció p53 responsable de l'atur del cicle cel·lular quan es produeix un dany en el DNA durant la fase G1. El tractament de cèl·lules normals amb agents que provoquen dany en el DNA es tradueix en un increment en els nivells de p21 i una acumulació en els complexos Cdk2-ciclina E, fet que desemboca en la reducció de l'activitat quinasa i l'atur del cicle cel·lular (Sheir and Roberts, 1995). Es pensa que aquest atur és via p21. P53 s'ha relacionat també amb l'inducció de l'apoptosis com a resposta al dany al DNA, però aquest fet és incompatible amb la funció de p21 (Chen et al. 1996). Línies cel·lulars transformades com HeLa i VA13 que contenen oncoproteïnes víriques que inactiven p53 tenen els nivells de 21 reduïts unes 5 vegades. Altres tipus cel·lulars sense p53 funcional com les cèl·lules HL60 i les Li-Fraumeni LCSO4 no presenten nivells detectables de 21. Ratolins *knockouts* de p21 es desenvolupen

normalment, però les seves cèl·lules no responen aturant el cicle en G1 com a conseqüència al dany en el DNA (Deng, et al., 1995).

L'expressió de p21 està també regulada independentment de p53. (Zeng and Deiry, 1996). Així, p21 pot respondre també a senyals enviades des de fora de la cèl·lula. S'han trobat llocs de reconeixement pel factor de transcripció STAT1 (resposta a EGF i a interferó gamma) en el promotor del gen que codifica p21 (Chin et al. 1996). També TGF- β indueix la transcripció de p21 i actua sobre elements del promotor del gen de p21 diferents als de p53 (Datto, et al., Li et al. 1995).

La p21 també s'ha relacionat directament amb la inhibició de les quinases SAPK que pertanyen a la família de les MAPK que s'activen per estrès per exemple el generat per dany en el DNA (Shim, et al., 1996).

Cal afegir que durant la senescència els nivells de p21 també incrementen molt. S'ha evidenciat la interacció directa de p21 amb el factor de transcripció E2F i la inhibició de la transcripció depenent d'aquest factor en fibroblastes senescents (Afshari et al. 1997).

A part de la funció com a inhibidor de cicle cel·lular a la p21 se li han atribuït altres funcions. S'ha postulat que podria actuar com a un factor d'acoblament dels complexos (Matsushime, et al., 1994 i LaBaer, et al. 1997) o com a proteïna necessària per la translocació de cdk4 i ciclina D1 al nucli (LaBaer, et al. 1997).

Els nivells normals de p21 també són necessaris pel desenvolupament normal dels organismes i pels processos de diferenciació cel·lular. Així ratolins transgènics que sobreexpressen p21 sobretot als hepatòcits, desenvolupen fetges desorganitzats, retard en el creixement i elevada mortalitat (Wu et al. 1996). En mioblasts en procés de diferenciació s'ha observat un increment en els nivells de mRNA i de proteïna p21 induïts degut al factor de transcripció MyoD independentment de p53 (Guo, et al., 1995).

Respecte a la degradació de p21, han estat detectades formes ubiquitinitzades de la proteïna *in vivo*, fet que indica que la p21 es degrada possiblement via ubiquitina (Maki and Howley, 1997).

p27 (KIP 1)

P27 (Polyak, et al., 1993) és un inhibidor de l'activitat de les cdk's que va ser descobert en cèl·lules aturades en G1 degut al tractament amb el factor de creixement TGF β o a l'inhibició per contacte. En aquestes cèl·lules els complexos cdk2-ciclina E no són actius degut a la interacció amb aquesta proteïna (Polyak, et al., 1994). La p27 té més afinitat per cdk4-ciclina D que per cdk2-ciclina E. En cèl·lules ciclants no tractades, també es detecta p27, però es troba segregada en els complexos cdk4-ciclina D. L'acció de TGF- β no incrementa els nivells totals de p27, però provoca canvis en la localització de la proteïna. TGF- β induïx l'expressió de p15 i és aquesta la que desplaça la p27 dels complexos cdk4 cap als complexos cdk2. Es tracta doncs d'un mecanisme de cooperació entre les dues famílies d'inhibidors que té com a resultat la formació dels complexos cdk4-ciclina D-p15 i cdk2-ciclina E-p27 inactius (Reynisdóttir and Massagué, 1997).

Ratolins *knockouts* de p27 són de mida més gran perquè tenen més cèl·lules de les normals i també presenten alguns tumors (Kiyokawa, et al., 1996).

p57 (KIP 2)

L'expressió de p57 està restringida a uns teixits determinats i els nivells més alts s'han trobat a la placenta. *In vitro* pot inhibir l'activitat quinasa de cdk2-ciclina A i E, cdk4 / 6-ciclina D i cdk3-ciclina E (Lee, et al., 1995). La transfecció de p57 provoca l'atur del cicle en G1 (Matsuoka, et al., 1995).

p16 (INK4a).

L'inhibidor p16 (Serrano, et al., 1993; revisat a Serrano, 1997). actua com a gen supressor de tumors, fet que s'ha comprovat perquè a l'afegir p16 exogen es suprimeix la transformació deguda a *Ha-ras* i *c-myc* (Serrano, et al., 1995). Els nivells de proteïna no varien en el cicle. El paper de p16 en un cicle normal no es coneix, però es postula que podria regular cdk4 i cdk6 una vegada pRb ja està hiperfosforilat. La microinjecció de plàsmids que codifiquen per p16 provoca l'atur del cicle en G1 només en aquelles cèl·lules que contenen pRb funcional (Lukas, et al., 1995) i per tant

es pensa que existeix una via p16/cdk4/ciclina D/pRb El molts tipus de càncer els components d'aquesta via s'han trobat desregulats. Així p16 i pRb són proteïnes supressores de tumors inactivades per mutacions puntuals, deleccions i metilacions dels promotors dels gens; i cdk4 i ciclina D són oncogens activats per translocacions, amplificacions i mutacions puntuals.

S'ha observat una acumulació de p16 en la senescència, quan hi ha expressió de ras oncogènic i en situacions en que pRb està inactivat. La pèrdua de p16 facilita la immortalització de les cèl.lules.

Ratolins *knockouts* de p16 i p19 creixen normalment, però desenvolupen alguns tumors de joves. Fibroblasts derivats d'aquest animals tenen una G1 més curta i per tant es dupliquen més ràpidament en cultiu (Serrano, et al., 1996).

p15 (INK4b) i TGF- β .

L'expressió de l'inhibidor p15 (Hannon, and Beach, 1994) incrementa com a resposta al tractament de les cèl.lules amb el TGF- β . P15 desplaça a l'inhibidor p27 dels complexos ciclina D-cdk4-p27 ja existents, cap als de cdk2-ciclina E com hem vist anteriorment (Reynisdottir, et al., 1995). La conseqüència de l'associació de p15 als complexos cdk4-ciclina D i de p27 als cdk2-ciclina E provoca la inhibició d'ambdues activitats quinases i l'atur del cicle a G1. Sembla ser que TGF β inhibeix també l'expressió de la fosfatasa cdc25A, fet que permet l'increment de la fosforilació en tirosines de cdk4/6 i la conseqüent inhibició de la seva activitat (Iavarone and Massagué, 1997).

L'efecte negatiu sobre la proliferació del factor de creixement TGF β ha estat objecte d'estudi molt intens últimament, el que ha fet que pràcticament tota la via de transducció de la senyal que genera es conegui com hem vist a l'apartat dels factors de creixement.

p14, p18 (INK4c) i p19 (INK4d/ARF).

La p14 (Guan, et al., 1994) s'ha trobat associada a cdk4 i cdk6 a diferència de la p18 (Guan, et al., 1994) que interacciona específicament amb cdk6. A l'igual que p16 la sobreexpressió de p18 només atura la proliferació si hi ha pRb funcional.

La p19 (Chan, et al., 1995) ha estat descrita com a inhibidor de cdk4 i cdk6 en limfòcits T i presenta els nivells màxims d'expressió a la fase S. P19 s'ha trobat associada també amb un factor de transcripció anomenat Nur 77 implicat a l'apoptosis (Hirai, et al., 1995). El mateix gen INK4a que codifica per la p16 també ho fa per la p19 per *splicing* alternatiu (Quelle, et al., 1995 i 1997).

2.2.3 Substrats de les cdks.

Actualment, una de les tasques més importants en l'estudi del cicle cel.lular és la identificació dels substrats de les cdks per tal de poder entendre el seu mecanisme d'actuació. Moltes proteïnes han estat proposades com possibles substrats de les cdks, però la dificultat més gran ha estat demostrar la fosforilació específica *in vivo* d'aquests substrats.

Per tal que una proteïna sigui considerada com un substrat d'una cdk calen un seguit de condicions (Nigg, 1993):

- 1) Cal que la proteïna es fosforili *in vitro* per un o més complex cdk-ciclina.
- 2) Hi ha d'haver un lloc *in vivo* de fosforilació.
- 3) Els llocs de fosforilacion *in vivo* i *in vitro* han de coincidir.
- 4) La fosforilació ha de provocar canvis en les propietats de la proteïna que repercuteixin en la progressió del cicle cel.lular.

S'han analitzat possibles substrats concretament per la cdc2 i s'ha identificat una seqüència consens de fosforilació per tots ells, una prolina que segueix als residus de serina o treonina (S / T- P -X -aminoàcid bàsic). Però de fet, altres proteïna quinases com la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK-3) i les proteïna quinases activades per mitògens (MAP quinases) presenten especificitats de substrat semblants (L / P- X - S / T- P), el que encara complica més la identificació dels substrats específics de

cada quinasa. Cal també afegir el paper que tenen les ciclins i la localització intracel·lular en la determinació de l'especificitat dels substrats de les cdk.

Com hem vist anteriorment el nombre més gran de substrats coneguts pertanyen a la cdc2, però recentment s'està avançant molt en la identificació dels substrats de la cdk2:

B-Myb és una *DNA-binding protein* que pertany a la família d'oncoproteïnes Myb. S'ha demostrat que el seu domini carboxi terminal actua com inhibidor de l'activitat transcripcional de Myb. La fosforilació de Myb en aquest extrem per cdk2-ciclina A l'allibera d'aquesta repressió (Ziebold, 1997).

E1A és una proteïna d'adenovirus que associa a proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular, entre elles pRb. Aquesta unió a pRb provoca l'alliberament del complex E2F-DP1 i permet la progressió cap a la fase S. La fosforilació de E1A afavoreix l'associació amb pRb. Cdk4, cdk2 i cdc2 poden fosforilar E1A (Mal, 1996).

El factor de transcripció E2F-1 regula l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes essencials per la progressió a la fase S. La seva activitat està regulada per la unió a altres proteïnes entre elles les que presenten un domini *pocket* (pRb, p107 i p130). pRb segresta els factors E2F inhibint així la seva activitat transcripcional. Cdk2-ciclina A fosforilen E2F durant la fase S (E2F-1 no és substrat de cdk4-ciclins D o cdk2-ciclina E). La fosforilació podria afegir un altre nivell de regulació de l'activitat d'aquesta proteïna reduint la capacitat d'interacció amb el seu promotor (Xu, 1994., Peeper, 1995., Kitagawa, 1995).

La proteïna Id2 de la família de les *helix-loop-helix* (HLH) actua com a regulador negatiu dels factors de transcripció del tipus *basic-helix-loop-helix* (bHLH) impeding la seva unió al DNA. La fosforilació de Id2 per cdk2-ciclina E/A reverteix aquest efecte (Hara, 1997).

L'oncoproteïna 18 és una proteïna que es troba sobreexpressada en moltes neoplàsies i que es fosforila com a resposta a diferents senyals externes. Es coneix que es fosforila per una quinasa dependent de calci i també per la família de les MAP quinases. Els seus nivells de fosforilació incrementen durant la fase S i arriben al màxim a la mitosi. S'ha implicat tant a la cdk2 com a la cdc2 en aquest fet. S'especula que l'oncoproteïna 18 podria actuar de pont entre la transducció de senyals i el cicle

cel·lular degut al fet que es fosforila a l'hora en llocs diferents per les MAP quinases i per la família de les cdk's (Brattsand, 1993).

L'inhibidor de cicle p27 es fosforila pel complex cdk2-ciclina E fet que determina la seva degradació i per tant la progressió del cicle cap a la fase S. Per tant la interacció cdk-inhibidor és doble, per una banda la unió provoca la inhibició de la quinasa i per l'altre l'enzim regula la eliminació de l'inhibidor (Sheaff, 1997).

L'enzim ribonucleòtid reductasa R2 és un enzim implicat en el sumministrament dels deoxiribonucleòtids necessari per a la síntesi i per a la reparació del DNA. La seva activació coincideix temporalment amb la fase S. La proteïna presenta dues subunitats R1 i R2 de les quals només R2 es fosforila. Existeixen evidències que relacionen la fosforilació de la proteïna i l'increment de la seva activitat. R2 es fosforila per cdk2 i per cdc2 (Chan, 1993).

El RP-A (replication protein A) és una proteïna d'unió al DNA de cadena senzilla implicada en la replicació del DNA. Esta formada per tres subunitats de 70, 34 i 11 kDa. Segons Fang (1993) durant la fase S només el RP-A unit al DNA es troba fosforilat, però aquesta fosforilació no és deguda directament a cdk2. En canvi la fosforilació de RP-A durant la mitosis és independent de l'associació amb la cromatina i és conseqüència de l'activitat cdc2. Pan et al. (1994) van demostrar que la fosforilació de RP-A és deguda a l'activitat cdk2-ciclina A en extractes de cel·lules HeLa en fase G1.

PRb també és substrat de cdk2 tal com descriuen Akiyama, et al (1992).

A part d'aquestes proteïnes hi ha altres substrats que han estat proposats, però la fosforilació *in vivo* encara no està demostrada. De totes maneres són uns bons candidats: entre ells la DNA Polimerasa α (Voitenleitner, et al., 1997), la p53 (Price, et al., 1995), i l'antigen T (Li, et al., 1997).

2.3 Senyals externes: L'adhesió a la matriu extracel·lular.

Les cel·lules dels teixits sòlids necessiten estar adherides a la matriu extracel·lular per tal de reproduir-se, i fins i tot en alguns casos per sobreviure. Aquesta dependència pel substrat es perd en la transformació oncogènica.

Les cèl.lules que no poden créixer adherides al substrat aturen el cicle cel.lular al G1. Treballs realitzats amb cèl.lules privades de l'adhesió descriuen alts nivells de l'inhibidor p27, baixos nivells de ciclina D, i inhibició d'activitat cdk2-ciclina E (Resnitzky, 1997); altres afegixen l'incapacitat de fosforilar pRb i la repressió de l'expressió de ciclina D (Zhu, et al., 1996); i una disminució en la fosforilació activadora de la treonina 160 de cdk2 (Fang, et al., 1996). La integritat del citoesquelet també sembla jugar un paper decisiu en aquest via perquè la seva disrupció atura el cicle de la mateixa manera que la manca d'adhesió (Bohmer, et al., 1996).

2.4. Senyals externes: la inhibició per contacte.

L'alta densitat de cèl.lules en un cultiu provoca l'atur del cicle cel.lular en G1. Aquestes cèl.lules no tenen complexos actius cdk2-ciclina E, sembla ser degut a l'associació de l'inhibidor p27 al complexos. Cal ressaltar que els efectes observats en l'inhibició per contacte són els mateixos que els obtinguts amb el tractament dels cultius amb TGF β (Polyak, K, et al., 1994).

3. Regulació del cicle cel.lular en eucariotes superiors

II.

Els sistemes de vigilància (*checkpoints*).

El cicle cel.lular té uns sistemes de vigilància (*checkpoints*), encarregats de la detecció de possibles errors produïts durant el transcurs del cicle. Els esdeveniments que tenen lloc durant el cicle cel.lular estan ordenats de manera que per tal que tingui lloc un nou pas, cal que l'anterior hagi finalitzat correctament.

Podríem dir que els *checkpoints* estan formats per diferents components: un mecanisme sensors encarregats de la vigilància i detecció d'errors; uns altres que

generen la senyal activadora d'aquest *checkpoint* determinat; uns sistemes de transducció de la informació des de el lloc de detecció de l'error fins la maquinària reguladora del cicle cel.lular; i per últim un sistema efector que s'activarà i generarà els mecanismes necessaris per arranjar aquest error. Si no es repara l'error es dispara un programa de mort. Si els *checkpoints* són eliminats o alterats, la cèl.lula pot morir, transmetre informació genètica incorrectament o bé incrementar el risc davant de pertorbacions externes com les irradiacions. Moltes cèl.lules canceroses tenen mancances en alguns dels *checkpoints*.

Han estat proposats diferents *checkpoints* en el cicle cel.lular :

Checkpoints del G1 i S:

- control de la mida de la cèl.lula (particular dels llevats; (Russell and Nurse, 1987)).

- control del dany en el DNA (revisat a Stewart and Enoch 1996; Levine, 1997; Paulovich, 1997; i Elledge, 1997).

- control de la re-replicació (comentat a l'apartat de la fase S i revisat a Romanowski and Madine, 1996; Stewart and Enoch, 1996; i Stillman, 1996).

Checkpoints de G2/M:

- control de la replicació no acabada (revisat a Stewart and Enoch, 1996).

- control del dany al DNA (revisat a Levine, 1997).

Checkpoints de mitosi:

- control de la correcta alineació dels cromosomes durant la metafase (revisat a Rudner and Murray, 1996).

Molts del *checkpoints* actuen aturant el cicle i així donen temps als sistemes de reparació de realitzar la seva funció; en els casos en que no és possible solucionar l'error produït s'indueix a la mort de la cèl.lula per tal que d'evitar que l'error es transmeti a la descendència. L'atur del cicle cel.lular es genera via inhibició de les cdks, i per tant, totes les proteïnes que actuen per sobre de les cdks poden ser dianes potencials del *checkpoints*.

Molts dels coneixements que es tenen fins ara sobre els *checkpoints* pertanyen al cicle del llevat, en aquest apartat ens centrarem només en els estudis realitzats en mamífers.

El *checkpoint* que atura el cicle en G1 degut a la detecció de lesions en el DNA és l'únic que es coneix relativament bé en eucariotes superiors. Hi ha tres gens mutats en la malaltia ataxia telangiectasia que són els que es creu que controlen aquest *checkpoint*: ATM (Savitsky, et al., 1995), p53 (Yin, et al., 1992) i p21 (Brugarolas, et al., 1995). Més del 50% dels càncers humans contenen mutacions en el gen que codifica per la p53. La p53 és un factor de transcripció que en condicions normals està present amb nivells baixos a la cèl.lula degut a la vida curta d'aquesta proteïna; en altres casos la p53 està present, però en una forma inactiva. Quan es produeix una situació d'estrès: lesió en la molècula de DNA, hipòxia (manca d'irrigació sanguínia), o bé mancança en el *pool* de ribonucleòsids trifosfats, els nivells de p53 incrementen i s'activa com a factor de transcripció. Les conseqüències d'aquesta activació poden ser l'atur del cicle o bé l'apoptosis.

P53 activa la transcripció de varies proteïnes entre elles la proteïna inhibidora de cdk's p21 que provoca l'atur del cicle en G1 (Sherr and Roberts, 1995). Aquesta no és l'única via per la qual p53 actua; es pensa que la fosforilació en tirosina de cdk4 podria ser necessària per l'atur del cicle cel.lular en G1 independentment de p21 (Terada, et al., 1995).

P53 també juga un paper important en induir apoptosis sota algunes condicions fisiològiques com són dany en el DNA en certs tipus cel.lulars, expressió de proteïnes víriques, expressió de certs oncogens o manca de gens supressors de tumors com pRb.

En tots els casos es postula que p53 podria actuar via directa interacció amb altres proteïnes i no només com a factor de transcripció.

Entre els gens regulats per p53 cal també anomenar la Gadd45 (Carrier, et al., 1994) el mecanisme d'acció de la qual és encara desconegut, però actua com a inductora de l'atur a G1. P53 també regula el gen BAX promotor de l'apoptosi (alteracions greus del DNA) i controla negativament bcl-2 promotor de la supervivència de la cèl.lula. MDM2 també està regulat positivament per p53. MDM2 s'uneix a p53 i la degrada el que podria funcionar com a *loop* per possibilitar l'entrada

al cicle després del bloqueig. MDM2 també estimula la funció de E2F. Per una altra banda pRb interacciona amb MDM2, però no se sap quina és la proteïna que resulta regulada (revisat a Hainaut, 1995).

Per últim, s'han trobat mutacions en el gen ATM en molts tipus de càncer. Aquest fet s'ha relacionat amb la regulació de p53, perquè mutacions en ATM redueixen la resposta de p53 davant al dany en el DNA. El mecanisme encara és desconegut.

4. La regeneració hepàtica i el cicle cel.lular.

4.1 El fetge.

El fetge és un òrgan essencial encarregat de moltes funcions, entre les que podem destacar el filtrat de la sang; magatzem de sang; el manteniment dels nivells de glucosa a la sang mitjançant la síntesi i degradació del glicogen; el manteniment dels nivells de lípids (síntesi de lípids i de lipoproteïnes plasmàtiques de transport); síntesi de proteïnes plasmàtiques (albúmina); síntesi de substàncies relacionades amb la coagulació de la sang (fibrinogen, protombina, factor III i altres); catabolisme de proteïnes i lipoproteïnes de la sang (immunoglobulines, albúmina, transferrina, insulina, i altres); catabolisme de drogues liposolubles (barbitúrics), captació i eliminació de bilirrubina; secreció de la bilis que conté entre d'altres substàncies les sals biliars; etc.

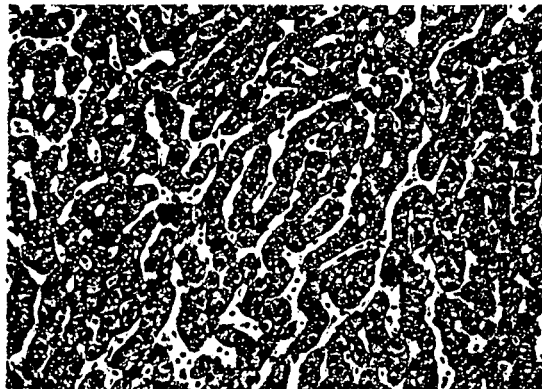


Fig 14. Parènquima hepàtic (Wheater, et al., 1980).

El fetge està constituït per diferents tipus cel.lulars: els hepatòcits o cel.lules parenquimàtiques, les cel.lules estrellades o de Ito, les cel.lules endotelials, i les cel.lules de Kupffer (macròfags). Els hepatòcits es distribueixen en làmines que es superposen unes sobre les altres i adopten una organització espacial en forma de políedres hexagonals que reben el nom de lobulets hepàtics.

El fetge és un òrgan molt vascularitzat, rep la sang a través de les vena porta i l'artèria hepàtica. La vena porta transporta la sang des del budell prim i la melsa cap el fetge, és sang rica en substàncies productes de la digestió (aminoàcids,...), però poc oxigenada. L'artèria hepàtica és l'encarregada de proveir al fetge de la sang oxigenada. Aquests grans vasos una vegada han arribat al fetge es ramifiquen en vasos més petits que es distribueixen en grups constituïts per una ramificació de la vena porta, una de l'artèria hepàtica i un canalicle biliar. Aquests grups es situen en els vèrtex dels lobulets hepàtics i reben el nom de tríades hepàtiques o àrees portals. La sang que prové de les àrees portals banya a cada una de les cel.lules del fetge a través dels sinusoids hepàtics que acaben drenant a la vena central del lobulett.

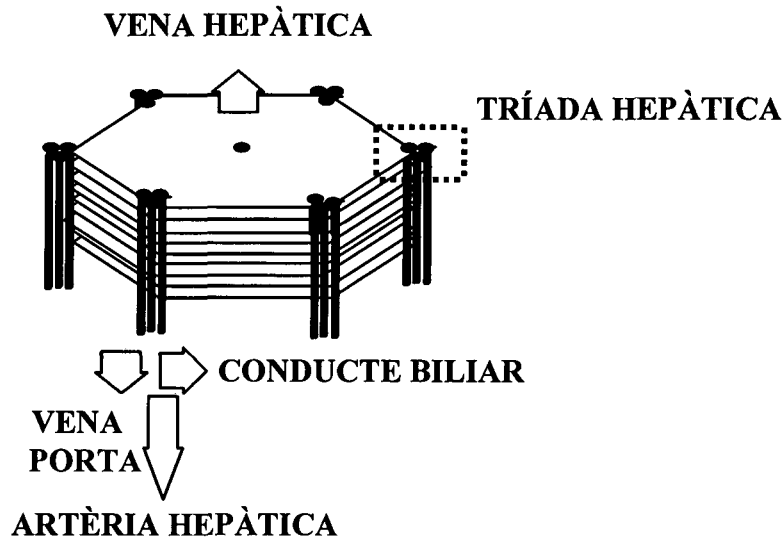


Fig 13. Estructura del lobulett hepàtic.

4.2 Característiques de la regeneració hepàtica.

La regeneració és la capacitat que té el fetge de restablir la massa tissular després d'una pèrdua i té com a resultat la hiperplàsia del teixit i la repoblació de les cèl.lules (revisat a Steer, 1995 i Michalopoulos and DeFrances, 1997).

Els hepatòcits adults són cèl.lules quiescents (només 1 de cada 20000 hepatòcits es dupliquen en el fetge adult) i altament diferenciades que poden entrar en cicle cel.lular i proliferar immediatament com a resposta a una pèrdua de massa hepàtica.

Aquesta pèrdua de teixit pot ser conseqüència de patologies (hepatitis vírica, cirrosis hepàtica i reaccions hepatotòxiques), o bé induïda experimentalment. Així, danys tòxics com el provocat per l'administració de Cl_4C (Mourelle and Rubalcalva, 1981), o físics com la pràctica d'una hepatectomia parcial tenen com a efecte final la regeneració hepàtica. L'administració endovenosa d'una mescla que conté triiodetironina, aminoàcids, glucagó i heparina dona lloc a hiperplàsia hepàtica (Short, et al., 1972); i una dieta sense proteïnes durant 3 dies suplementada més tard també provoca una resposta proliferativa en el fetge. Cal assenyalar que el tipus de resposta proliferativa en cada cas difereix una mica.

Algunes de les característiques de la regeneració hepàtica són les següents: la resposta regenerativa del fetge és proporcional a la quantitat de fetge extret; la resposta proliferativa no depèn de *stem cells*; el 96 % dels hepatòcits que romanen en el fetge operat es dupliquen una o dues vegades; la proliferació comença a l'àrea dels lobulets propera a les tríades hepàtiques; durant el període proliferatiu es mantenen les funcions metabòliques del fetge; i factors com l'edat, l'alimentació dels animals i els ritmes circadians influeixen en la resposta proliferativa del fetge.

4.2.1 L'hepatectomia parcial (HP).

L'hepatectomia parcial a la rata consisteix en l'extracció quirúrgica de dues terceres parts del fetge (extirpació de dos dels seus lòbuls grans). La tècnica va ser posada a punt ja a l'any 1931 per Higgins i Anderson. S'escullen rates joves mascles d'uns 250 grams perquè hi ha evidències que demostren que la capacitat regenerativa és més gran en animals joves que en animals vells. Després de l'operació les cèl.lules

dels lòbuls restants proliferen fins que el fetge recupera la massa inicial en un període de temps d'aproximadament 7 dies. Un cop assolit l'objectiu les cèl·lules del fetge retornen a l'estat de quiescència inicial.

4.2.2 El cicle cel·lular durant la regeneració hepàtica.

Immediatament després de l'HP les cèl·lules del fetge que resten abandonen l'estat de quiescència o G0 per entrar a la fase G1 del cicle cel·lular. 14 hores més tard el 35 % dels hepatòcits comencen a sintetitzar DNA, el pic màxim de síntesi s'observa a les 24 hores post HP. El nombre més elevat de mitosis es detecta 6 hores més tard. La replicació de les cèl·lules que no són hepatòcits té lloc amb un retard d'unes 24 hores. Es creu que aquestes cèl·lules tenen un G1 més llarg, però segueixen el mateix patró de sincronia que els hepatòcits. Al final del procés de regeneració, quan el fetge ha restablert la seva massa inicial, totes les cèl·lules s'han dividit una o dues vegades.

4.2.3 La funcionalitat del fetge durant la regeneració.

El fetge és un òrgan molt important per a l'organisme i ha de mantenir la seva funcionalitat metabòlica i sintètica durant el procés de regeneració. Una evidència d'aquest fet és la caiguda dels nivells d'insulina i l'increment dels de glucagó en sang que s'observa post HP per tal de compensar la hipoglucèmia produïda per la pèrdua de massa hepàtica. També s'observa una adaptació d'altres gens implicats en el metabolisme de la glucosa durant la regeneració. Més de 70 gens de resposta immediata s'indueixen després d'una HP i molts d'ells estan relacionats amb l'adaptació funcional del fetge. És molt interessant recalcar el fet que els hepatòcits en cultiu a més de desdiferenciar-se perden l'expressió de molts factors de transcripció típicament hepàtics cosa que en el fetge regenerant no passa.

Per tant cal destacar aquesta capacitat que té el fetge de respondre a la HP tant a nivell funcional com a nivell proliferatiu.

4.2.4 Els factors de creixement i la transducció del senyal durant la proliferació hepàtica.

Els mecanismes responsables de disparar el senyal proliferatiu després de l'hepatectomia parcial encara no es coneixen totalment (revisat a Fausto, et al., 1995 i Diehl and Rai., 1995).

Després d'una HP s'observa un augment en els nivells en sang d'alguns factors de creixement com l'*epidermal growth factor* (EGF), *el transforming growth factor α* (TGF α), i l' *hepatocyte growth factor* (HGF); i també de certes hormones alliberades degut al estrès metabòlic i quirúrgic. *In vitro* (cultius d'hepatòcits sense sèrum) s'han evidenciat una sèrie substàncies que estimulen la síntesi de DNA (mitògens) (EGF, TGF α , HGF, *heparin binding growth factor*, i *keratinocyte growth factor* (KGF)). Altres substàncies complementen l'efecte estimulador dels mitògens (comitògens)(insulina, glucagó, *insulin-like growth factors*, hormones adrenocorticals, *norepinephine*, vassopressina, angiotensina, hormones del tiroides i paratiroides, calci, vitamina D i certs nutrients). Factors inhibidors de la proliferació hepàtica se'n coneixen pocs, algunes interleuquines i el *transforming growth factor β* (TGF- β).

Molts dels estudis realitzats en aquest camp s'han iniciat en cultius cel.lulars d'hepatòcits. Aquests són molt més sensibles als efectes dels mitògens que els hepatòcits en el fetge intacte. Els hepatòcits en el fetge són cèl.lules que presenten una gran heterogeneïtat donada per diferents factors: l'estat de maduració; una gran plasticitat que fa possible una resposta adequada per cada requeriment; l'estructura de lobulet hepàtic que permet una diferent resposta local dels hepatòcits depenent de les senyals extracel.lulars que reben; una heterogeneïtat a nivell ambiental referida a la composició de la matriu extracel.lular; la relació amb les cèl.lules veïnes (endotelials, Kupffer i estrellades); i el lliurament selectiu d'elements transportats per les sang venosa i arterial. Degut a que tots aquests elements poden participar en la resposta dels hepatòcits en front les senyals proliferatives s'ha d'anar molt en compte a l'hora d'extrapolar els resultats obtinguts en els estudis realitzats amb cultius cel.lulars.

L' EGF: L'EGF és un factor de creixement sintetitzat per les glàndules salivals (la seva extirpació retarda 24 hores el pic de síntesi del DNA observat després de la HP). S'ha detectat síntesi del mRNA i del pèptid a temps molt curts després de la HP , així com una *down* regulació del receptor poc després, el que fa

pensar que aquest factor actua molt aviat i possiblement també a través de vies autocrines. Els nivells en sang d'EGF incrementen només un 30% després de la HP, però la concentració d'EGF disponible per unitat de pes de fetge incrementa unes tres vegades degut a la disminució de la massa hepàtica. A més la *norepinephrine* que incrementa molt després de la HP estimula la secreció d'EGF.

L'EGF està present a la sang en els animals normals, però només actua com a mitogen en els animals posthepatectomitzats. És possible que calgui un increment en el nombre de receptors per l'EGF o bé algun altre tipus de canvi en els receptors per tal que el factor sigui reconegut.

El TGF- α : El TGF- α és un factor de creixement sintetitzat pels propis hepatòcits. El seu receptor és el mateix que el de l'EGF. El mRNA incrementa de les 4 a les 24 hores post HP i el pèptid ho fa de les 24 a les 48 hores, per tant actua en estadis més tardans que l'EGF.

La sobreexpressió de TGF- α en ratolins transgènics indueix als hepatòcits adults a proliferar (Webber, et al., 1994). L'expressió constitutiva de TGF- α va associada a la proliferació dels hepatòcits durant la fase postnatal de creixement hepàtic, i la disminució de la proliferació que s'observa a partir de la tercera setmana després del naixement va acompanyada d'una reducció dels nivells del factor. La supressió de TGF- α en ratolins *knockout* només provoca algunes petites alteracions, i la regeneració del teixit després de la HP és desenvolupa normalment.

L'HGF: L'HGF és sintetitzat per les cèl.lules de Ito del fetge i per cèl.lules mesenquimàtiques d'altres teixits. Els nivells en plasma de l'HGF incrementen unes 20 vegades una hora post-HP, després van disminuint durant les primeres 24 hores, però romanen elevats unes 72 hores. Aquest increment tant alt d'HGF s'explica per l'alliberament de l'HGF retingut a la matriu extracel.lular degut al trencament que es produeix després de la HP. A l'igual que l'EGF, els nivells circulants de l'HGF són elevats, però només actua com a mitogen prèvia sensibilització de les cèl.lules afectades possiblement també a nivell de receptor.

Els animals transgènics que sobreexpressen HGF recuperen la massa inicial del fetge després de la PH més ràpidament que els animals normals, i els fetges són més grans. Els animals amb el gen de HGF inactiu moren durant el desenvolupament embrionari.

TNF- α (tumor necrosis factor α): Aquest factor és sintetitzat per les cèl.lules de Kupffer. Ratolins deficients en el receptor tipus I de TNF- α no experimenten l'increment que s'observa en ratolins normals de l'activitat STAT3 i NF- $\kappa\beta$ i de la síntesi del DNA després de la HP (Yamada, et al., 1997). Aquest efecte és revertit amb l'administració de IL-6 (comitogen també sintetitzat per les cèl.lules de Kupffer). Es pensa que aquest factor de creixement i la IL-6 són essencials per l'etapa de sensibilització que comentarem més endavant.

TGF- β : Els nivells de mRNA del TGF- β incrementen unes 8 vegades després de la primera ona de divisió dels hepatòcits. Aquest missatger es troba localitzat majoritàriament en cèl.lules no parenquimàtiques. TGF- β inhibeix la síntesi de DNA en hepatòcits en cultiu, el que fa pensar que *in vivo* també és responsable de generar senyals inhibidores de proliferació encara que aquesta teoria no ha estat demostrada. L'administració *in vivo* de TGF- β inhibeix la síntesi de DNA durant la regeneració i provoca també una disminució de l'expressió de cdk4 i ciclina E (Fan, et al. 1995).

4.2.5 El *priming* o sensibilització.

L'administració via endovenosa d'EGF, TGF- α o HGF a rates normals no indueix significativament la síntesi de DNA. La pràctica d'una HP del 30 % incrementa l'expressió de c-myc però no es sintetitza DNA. L'administració d'aquests factors després d'una HP del 30%, ara sí, desencadena la síntesi del DNA. El tractament amb colagenasa produeix també el mateix efecte.

A partir d'aquestes evidències es postula que els hepatòcits després d'una HP han d'assolir un estat de competència o *priming* que els farà sensibles a l'acció del mitògens. Aquest fet seria molt ràpid i compendria la generació de potencials redox i l'acció de factors de creixement com el *Tumor necrosis factor α* (TNF) o altres (*interleukin-1 y 6* (IL-1, 6)). Aquests serien alhora responsables de l'activació postraduccionals i la translocació al nucli de certs factors de transcripció tipus *posthepatectomy factor/nuclear factor- $\kappa\beta$* (NF- $\kappa\beta$) (pic entre 30'-1h post HP) i STAT3 (pic a les 3h post HP) preexistents en el fetge. Aquests factors activarien la

transcripció de gens necessaris per la sensibilització segurament dels receptors dels factors de creixement esmentats.

Els primers gens que s'expressen després de la PH són els anomenats de resposta primerenca que codifiquen entre altres, factors de transcripció com c-fos i c-jun (fet responsable de l'activació de AP1) i de proteïnes importants pel metabolisme cel.lular (manteniment de l'homeostasi de la glucosa). Així, després d'una HP els nivells de mRNA de c-fos incrementen immediatament i decauen a les 2 hores. Els nivells de mRNA de c-myc assoleixen un màxim entre els 30' i les 2 hores (Thompson, et al., 1986). Algunes d'aquestes proteïnes regulen la transcripció dels gens de resposta tardana, unes hores més tard, involucrats en fases més avançades del cicle.

Les vies de regulació de la proliferació en la regeneració hepàtica i la hiperplàsia produïda per mitògens no són iguals. L'activació de NF- κ B, c-fos, c-jun i c-myc no s'observen a la hiperplàsia. Sembla que HGF i TGF α tampoc juguen cap paper en aquest cas (Columbano and Shinozuka, 1996).

Cal dir també que a part del canvis comentats, durant la regeneració hepàtica es produeixen modificacions molt importants a nivell de composició de la membrana plasmàtica, tràfic intracel.lular de proteïnes, organització de la matriu extracel.lular i variacions en l'activitat i nivells de molts components citoplasmàtics i nuclears (revisat a Bachs i Enrich, 1997).

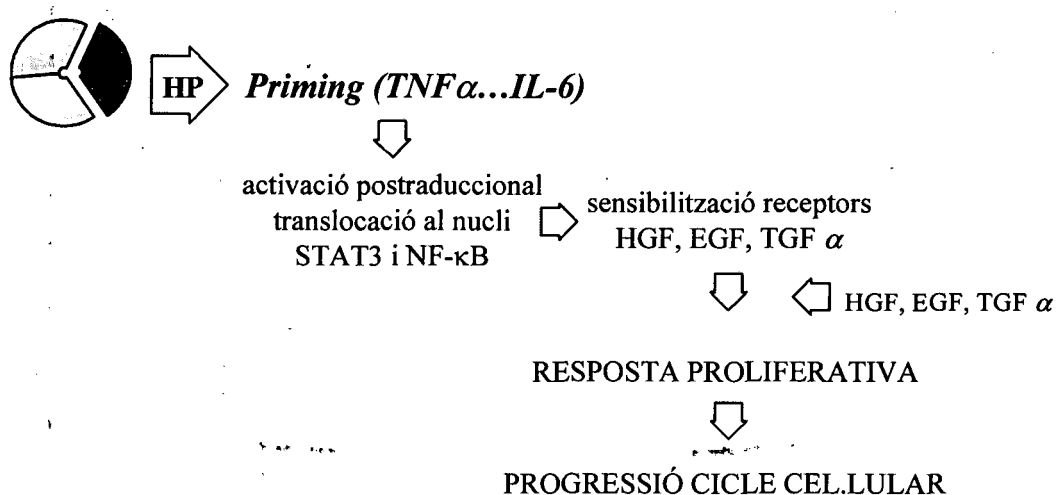


Fig 15. Teoria del "priming" o sensibilització.

4.2.6 La maquinària reguladora del cicle cel.lular durant la regeneració hepàtica.

Existeix fins el moment poca informació sobre la regulació del cicle cel.lular durant la proliferació hepàtica post-HP.

Lu, et al (1992) i Albrecht, et al (1993) van analitzar els mRNA de cdc2, les ciclines E, C, D, A, B1, i B2, així com l'activitat quinasa associada a les ciclines A i B1. Loyer, et al. (1994) van estudiar per primera vegada els patrons d'expressió d'algunes d'aquestes proteïnes: cdk2, cdc2, ciclines E i D; així com l'activitat quinasa associada a la cdk2 i la cdc2. Rininger, et al (1997) i Ehrenfried, et al. (1997) van ampliar el ventall de proteïnes analitzades amb la cdk4, 5, ciclines D1, D3, PCNA, pRb, p53, p16, p21, i p27. Rinaudo, et al., (1997) van identificar una forma fosforilada de la ciclina A a les 26 hores post HP. Fan, et al. (1995) van establir que pRb presentava tres pics d'expressió (24, 30, i 72 hores post HP) i que es trobava majoritàriament hiperfosforilat durant tot el període de regeneració hepàtica, a diferència dels resultats obtinguts en cultius primaris d'hepatòcits on els nivells de pRb romanien constants durant el cicle i eren els nivells de fosforilació els que variaven. Els resultats obtinguts per aquests grups no són del tot coincidents però tots assenyalen la presència en fetge quiescent de moltes de les proteïnes reguladores de cicle, un pic d'activitat cdk2 i de síntesi del DNA a les 24 hores post HP, i un pic màxim d'activitat cdc2 corresponent a la fase de mitosis.

Ratolins transgènics per p21 presenten la proliferació postnatal dels hepatòcits inhibida i tampoc s'observa cap resposta regenerativa després de practicar l'HP (Wu, et al., 1996). Els nivells mRNA de la p21 va incrementant des de la quiescència cap a la fase S i estan regulats per vies dependents i independents de p53 (Albrecht, et al., 1997).

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

Montserrat Jaumot i Pijoan, 1998

OBJECTIUS.

Objectius.

1- Identificació de nous substrats de cdk2 en diferents models cel.lulars: cèl.lules HeLa, hepatòcits normals activats a proliferar mitjançant una hepatectomia parcial, limfòcits humans normals activats a proliferar, i la línia limfoide Namalwa.

2- Localització intranuclear de proteïnes que participen en el control del cicle cel.lular en dos models de proliferació un normal i l'altre transformat: hepatòcits normals activats a proliferar mitjançant una hepatectomia parcial, i la línia cel.lular transformada d'origen humà HeLa.

3- Anàlisi dels mecanismes d'activació de la cdk4 i la cdk2 durant la regeneració hepàtica.

RESULTATS.

Resultats.

Els resultats obtinguts s'ha exposat en quatre capítols. Cada capítol consta del resum de l'article presentat en el capítol, l'article original (*reprint* o manuscrit original), i d'un o varis annexes que complementen la informació de l'article.

Capítol I:

Possibles nous substrats nuclears de cdk2 en cèl.lules normals i transformades. Putative nuclear cdk2 substrates in normal and transformed cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 219, 1996. Pàgines 560-564.

Capítol II:

Els complexos ciclina A-cdk2 fosforilen l'inhibidor de cicle cel.lular p21CIP. The cell cycle inhibitor p21CIP is phosphorylated by cyclin A-dk2 complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 241, 1997. Pàgines 434-438.

Capítol III:

Complexes ciclina-cdk2 en el nucli de cèl.lules HeLa. Cyclin/cdk2 complexes in the nucleus of HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 203, Nº. 3, 1994. Pàgines 1527-1534.

Capítol IV:

L'activació de la cdk4 i la cdk2 durant la regeneració hepàtica a la rata està associada a la reordenació intranuclear dels complexos ciclina-cdk.

Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated to intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. Enviat a *Gastroenterology*.

CAPÍTOL I.

Complexes ciclina-cdk2 en el nucli de cèl.lules HeLa.

Resum

El cicle cel.lular en els eucariotes superiors està regulat per l'activació i inactivació seqüencial de les quinases dependents de ciclins (cdks). Aquests enzims estan regulats a tres nivells diferents: la fosforilació-defosforilació en llocs activadors i inhibidors; l'associació a les seves subunitats reguladores, les ciclins; i la unió a proteïnes inhibidores o CKIs. L'estudi dels components dels complexos que formen aquestes quinases és essencial per tal d'entendre la seva regulació i mecanisme d'actuació. La colocalització amb altres proteïnes de funció coneguda pot obrir noves perspectives funcionals per a les proteïnes de cicle que estem analitzant.

Els objectius de l'article presentat en aquest capítol han estat: 1) analitzar la localització subnuclear de quatre de les proteïnes de cicle: cdk2, ciclina A, cdc2 i ciclina B juntament amb la DNA polimerasa α ; 2) estudiar els complexos que formen aquestes proteïnes utilitzant els gradients continus de sacarosa emprats per altres autors per aïllar complexos replitasa; i 3) iniciar la identificació de possibles nous substrats nuclears de cdk2.

El model cel.lular utilitzat en aquest estudi ha estat la línia cel.lular HeLa. Aquestes cèl.lules deriven d'un carcinoma de cèrvix humà i tenen morfologia epitelial.

El tractament de nuclis purificats amb nucleases, DNasa i RNasa permet obtenir una fracció soluble anomenada S1. La S1 allibera preferentment proteïnes associades al hnRNA i/o a les hnribonucleopartícules localitzades en els llocs de transcripció. Els anàlisis mitjançant immunoblot de la cdk2, cdc2, ciclina A i ciclina B d'aquesta subfracció nuclear assenyalen que totes aquestes proteïnes són sensibles parcialment a aquest tipus de tractament, i per tant, podrien estar relacionades amb els mecanismes de transcripció i/o de processament del RNA. Els resultats indiquen que la DNA polimerasa α també s'allibera dels nuclis de la mateixa manera; i per tant que

proteïnes relacionades amb la síntesi del DNA són parcialment sensibles a l'extracció amb nucleases.

Si el sediment residual després del tractament amb nucleases es tracta amb NaCl 1.6 M s'obté una nova fracció soluble anomenada S2 que conté majoritàriament les histones. Les proteïnes insolubles que resten formen part de la matriu nuclear. Tal com hem vist a la introducció els orígens de replicació, la síntesi del DNA, la DNA polimerasa/primasa i altres enzims replicatius estan anclats en aquesta estructura. Anàlisi per immunoblot de la S2 i la matriu nuclear assenyalen que les ciclins són sensibles al tractament amb sal, però que les cdk's ho són només parcialment a l'igual que l'enzim replicatiu DNA polimerasa α .

Com a conclusió d'aquests experiments es pot dir que en el nucli de les cèl·lules HeLa existeixen dos *pools* de cdk's, un associat a la matriu nuclear i un altre sensible a l'acció de les nucleases; aquests fets assenyalen que les cdk's podrien estar localitzades en els llocs de replicació i/o en els llocs de transcripció i participar activament en aquests processos.

Una aproximació a l'estudi dels complexos nuclears que formen les proteïnes de cicle s'ha realitzat analitzant per immunoblot les fraccions obtingudes de gradients continus de sucrosa. Aquests gradients havien estat dissenyats per Reddy, et al (1980) per aïllar els macrocomplexes que contenen els enzims de replicació del DNA, més els de síntesi dels dNTP i s'anomenen replitasa. Westernblots realitzats amb anticossos contra el PCNA i la DNA polimerasa α evidencien dos pics en el gradient, un corresponent a complexos petits i l'altre a complexos de mida més gran i que corresponen al lloc del gradient on es situen els complexos replitasa. Els resultats obtinguts amb els anticossos anti cdk2 i ciclina A coincideixen amb els anteriors. Contràriament, la cdk2 i ciclina B es distribueixen en un sol pic corresponent als complexos petits. Per tal d'esbrinar si els complexos resolts en els gradients eren actius, es van realitzar assajos d'activitat quinasa associada a la histona H1 en els immunoprecipitats obtinguts de totes les fraccions amb anticossos anti cdk2 i ciclina A. Els resultats indiquen que tots els complexos aïllats són actius. Sembla ser, per tant, que la cdk2 i la ciclina A colocalitzen en el gradient amb la DNA polimerasa α i amb el PCNA en fraccions corresponents a complexos grans amb activitat quinasa, i que segons altres autors, aquestes fraccions contenen els complexos replitasa.

Per últim es es va analitzar la presència de possibles nous substrats de cdk2 a partir d'immunoprecipitats d'una fracció nuclear de cèl.lules HeLa seguits d'assajos de fosforilació amb absència de substrat extern. Els resultats assenyalen que una proteïna de 18-21 kDa es fosforila específicament i esdevé un bon candidat a substrat de la cdk2.

CYCLIN/CDK2 COMPLEXES IN THE NUCLEUS OF HELA CELLS

Montserrat Jaumot¹, Xavier Graña², Antonio Giordano^{2**}, Prem Veer Reddy³,
Neus Agell¹, and Oriol Bachs^{1*}¹Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, University
of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain²Department of Biochemistry and Pathology, Temple University,
School of Medicine, Philadelphia, PA 19140³Cancer Center and Department of Cell Biology, University of
Massachusetts, Medical Center, Worcester, MA 01605

Received July 28, 1994

SUMMARY: Two different fractions of cdk2 and cdc2 have been found in the nucleus of HeLa cells. One, which can be extracted by nuclease treatment, possibly associated with DNA- or RNA-containing structures and another one, which is bound to the nuclear matrix. Nuclear cdk2 forms high molecular weight complexes which migrate at the same position as DNA polymerase α and proliferating cell nuclear antigen in sucrose gradient centrifugation experiments. These results suggest that nuclear cdk2 complexes could be associated with the replication factories. Immunoprecipitation experiments reveal that nuclear cdk2 complexes display histone H1-kinase activity and phosphorylate a protein of 18 kDa which is present in these complexes. © 1994 Academic Press, Inc.

In higher eukaryotes, the cell cycle is regulated, at least in part, by cyclin-dependent kinases (cdks) associated with cyclins (1). The cdk family comprises 6 members (cdk1, 2, 3, 4, 5, and 6) which can bind to different cyclins (cyclins A, B, C, D and E) (1). The regulation of the cell cycle is accomplished by the association of the different cdks to specific cyclins at fixed points of the cycle (2). These specific cyclin/ckd complexes phosphorylate particular protein substrates which are essential for triggering key events such as DNA replication and mitosis during cell cycle (2). In recent years, compelling details of the specific cyclin/ckd complexes occurring at the different points of the cell cycle have been obtained. The most well characterized cdks are cdk1 and cdk2. Cdk1, best known as cdc2, is the homolog of the p34^{cdc2} from fission yeast (3). Cdc2 associated with cyclin B is required for mitosis entry (3).

**Present address: Institute for Cancer Research and Molecular Medicine and Jefferson Cancer Institute, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA.

* To whom correspondence should be addressed.

Cdk2 associates with cyclin E during G1 and with cyclin A during S and G2 phases and its activity is required for the onset of S phase (4). Cyclin A/cdk2 complexes are required for DNA replication in both normal and transformed mammalian cells (5). In certain situations, cyclin A can be oncogenic. The hepatitis B virus has been found to be integrated into the cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma and a complex containing cdk2/cyclin A, p107, and E2F is a target for the adenovirus oncoprotein E1A, suggesting that cdk2/cyclin A may play a role in oncogenic transformation by DNA tumor viruses (6). The involvement of cyclin A/cdk2 complexes in DNA synthesis suggests that these complexes mainly operate in the cell nucleus. Accordingly, it has been reported that cyclin A is located in the cytosol during G1, and then, part of it translocates into the nucleus during S phase (7). However, a recent report reveals that cyclin A is also present in microsomal and plasma membrane fractions of rat liver cells during the replicative phase, suggesting that cyclin A/cdk2 complexes operate at different intracellular sites during S phase (8). To establish the mechanisms by which cdk2/cyclin A complexes work during S phase it is essential to identify their substrates in each of the intracellular structures. However, only a few number of putative nuclear protein substrates for cdk2 which operate during G1/S and S phases have been identified: the replication factor A (RPA), a protein which binds to ssDNA at the replication forks and two proteins encoded by tumor suppressor genes, namely pRb and p53 (2).

We have investigated here the intranuclear localization of cyclins and cdk2 in proliferating HeLa cells and also the existence of possible nuclear protein substrates for cdk2. Results revealed the presence of two pools of nuclear cdk2 and cdc2, one sensitive to the action of nucleases and the other one bound to the nuclear matrix. Nuclear cdk2 forms complexes with cyclin A and also with a protein of 18 kDa, which appear to be a good candidate as a substrate for cdk2 containing complexes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of nuclear extracts. Nuclei from HeLa cells, obtained as previously described (9), were subfractionated according to Kaufmann and Shaper (10). Briefly, purified nuclei were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], and 0.5 µg/ml aprotinin), containing 250 µg/ml DNase I and/or 250 µg/ml RNase A. After 1 h incubation at 4 °C, nuclei were sedimented at 800 x g for 10 min. The supernatant was collected and named S1. The pellet of the nuclease-treated nuclei was then resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM MgSO₄, 1 mM PMSF and 0.3 µg/ml aprotinin (buffer B). Buffer B containing 2 M NaCl was then slowly added to a final NaCl concentration of 1.6 M. After a 15 min incubation, the residual structures were sedimented at 5000 x g for 20 min. The pellet corresponded to the nuclear matrix (M) and the supernatant was called S2. For the sucrose density gradient experiments and immunoprecipitations, nuclear extracts were prepared as following: HeLa cells were suspended in buffer C (150 mM sucrose, 80 mM KCl, 35 mM Hepes, pH 7.4, 5 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 25 µM CaCl₂, 2 mM PMSF, and 8 mM dithiothreitol) at a density of 5 X 10⁷ cells/ml. The cells were homogenized with a Potter-Elvehjem with Teflon pestle and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The pellet containing the nuclei, was suspended in buffer C and sonicated with 2 pulses of 20 sec each at setting 2 using a Branson sonifier. A soluble nuclear fraction was obtained by centrifugation of the sonicated pellet at 3000 rpm for 10 min at 4 °C.

Sucrose density gradient centrifugation. The nuclear extract obtained by sonication was layered onto a linear sucrose density gradient (10-40%) and centrifuged at 35,000 rpm for 5 h at 4 °C in a Beckmann SW 50.1 rotor. Fractions of 500 μ l were collected, and then subjected to western blotting. Fractions 9 and 10 from the first gradient were mixed and treated with DNase and RNase (50 μ g/ml) and layered onto a second linear gradient of 10-40% sucrose. The samples of the second gradient were also subjected to western blotting. Alternatively, experiments with 20-60% linear sucrose gradients were also carried out.

Immunoblotting. Western blot experiments were carried out as previously described (9). The following antibodies were used: anti-cdk2 (UBI), 2 μ g/ml; anti-cyclin A (UBI), 2.5 μ g/ml; anti-cdc2 (UBI), 2 μ g/ml; anti-cyclin B1 (UBI), 1 μ g/ml; anti-DNA Polymerase α (UBI), 1:10 dilution, and anti-PCNA (Boehringer Mannheim), 1:100 dilution.

Immunoprecipitation and histone H1 kinase activity. The samples were diluted with buffer C and then precleared with a normal rabbit serum and protein A beads. After centrifugation, the supernatants were incubated with the antibodies for 1 h at 4 °C followed by an incubation with Protein A beads for 1 h at 4 °C. The immunoprecipitates were then washed and the kinase assay carried out in the presence or absence of histone H1 as described by Graña et al. (11).

RESULTS

Purified nuclei from HeLa cells were extracted with a mixture of DNase I and RNase A (S1 fraction), and subsequently with a high salt-containing buffer (S2 fraction) as described under Materials and Methods. The obtained fractions were then subjected to western blot analysis using antibodies against cyclin A, cyclin B, cdk2, cdc2, and DNA polymerase α . As shown in figure 1, all these proteins were detected in S1 and S2 extracts, and no differences were observed when the incubation was carried out with only DNase or RNase (data not shown). However, in the residual nuclear matrix, a differential distribution of these proteins was observed: both cdks (cdk2 and cdc2) were present in the nuclear matrix, whereas, cyclins A and B were absent (figure 1). DNA polymerase α , a major component of the replisome

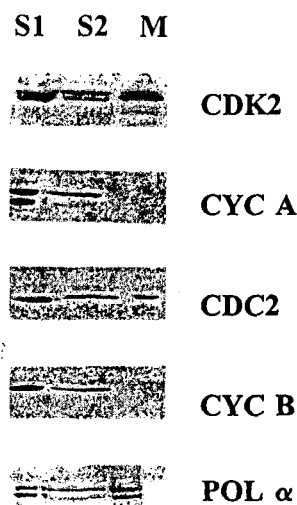


Fig. 1. Location of cdks and cyclins in several nuclear subfractions. S1, S2 and nuclear matrix from HeLa cells were obtained as described under Materials and Methods. The samples were analyzed by western blotting using antibodies against cdk2, cyclin A (CYC A), cdc2, cyclin B (CYC B), and DNA polymerase α (POL α).

Cdk2 associates with cyclin E during G1 and with cyclin A during S and G2 phases and its activity is required for the onset of S phase (4). Cyclin A/cdk2 complexes are required for DNA replication in both normal and transformed mammalian cells (5). In certain situations, cyclin A can be oncogenic. The hepatitis B virus has been found to be integrated into the cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma and a complex containing cdk2/cyclin A, p107, and E2F is a target for the adenovirus oncoprotein E1A, suggesting that cdk2/cyclin A may play a role in oncogenic transformation by DNA tumor viruses (6). The involvement of cyclin A/cdk2 complexes in DNA synthesis suggests that these complexes mainly operate in the cell nucleus. Accordingly, it has been reported that cyclin A is located in the cytosol during G1, and then, part of it translocates into the nucleus during S phase (7). However, a recent report reveals that cyclin A is also present in microsomal and plasma membrane fractions of rat liver cells during the replicative phase, suggesting that cyclin A/cdk2 complexes operate at different intracellular sites during S phase (8). To establish the mechanisms by which cdk2/cyclin A complexes work during S phase it is essential to identify their substrates in each of the intracellular structures. However, only a few number of putative nuclear protein substrates for cdk2 which operate during G1/S and S phases have been identified: the replication factor A (RPA), a protein which binds to ssDNA at the replication forks and two proteins encoded by tumor suppressor genes, namely pRb and p53 (2).

We have investigated here the intranuclear localization of cyclins and cdk2 in proliferating HeLa cells and also the existence of possible nuclear protein substrates for cdk2. Results revealed the presence of two pools of nuclear cdk2 and cdc2, one sensitive to the action of nucleases and the other one bound to the nuclear matrix. Nuclear cdk2 forms complexes with cyclin A and also with a protein of 18 kDa, which appear to be a good candidate as a substrate for cdk2 containing complexes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of nuclear extracts. Nuclei from HeLa cells, obtained as previously described (9), were subfractionated according to Kaufmann and Shaper (10). Briefly, purified nuclei were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], and 0.5 µg/ml aprotinin), containing 250 µg/ml DNase I and/or 250 µg/ml RNase A. After 1 h incubation at 4 °C, nuclei were sedimented at 800 x g for 10 min. The supernatant was collected and named S1. The pellet of the nuclease-treated nuclei was then resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM MgSO₄, 1 mM PMSF and 0.3 µg/ml aprotinin (buffer B). Buffer B containing 2 M NaCl was then slowly added to a final NaCl concentration of 1.6 M. After a 15 min incubation, the residual structures were sedimented at 5000 x g for 20 min. The pellet corresponded to the nuclear matrix (M) and the supernatant was called S2. For the sucrose density gradient experiments and immunoprecipitations, nuclear extracts were prepared as following: HeLa cells were suspended in buffer C (150 mM sucrose, 80 mM KCl, 35 mM Hepes, pH 7.4, 5 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 25 µM CaCl₂, 2 mM PMSF, and 8 mM dithiothreitol) at a density of 5 X 10⁷ cells/ml. The cells were homogenized with a Potter-Elvehjem with Teflon pestle and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The pellet containing the nuclei, was suspended in buffer C and sonicated with 2 pulses of 20 sec each at setting 2 using a Branson sonifier. A soluble nuclear fraction was obtained by centrifugation of the sonicated pellet at 3000 rpm for 10 min at 4 °C.

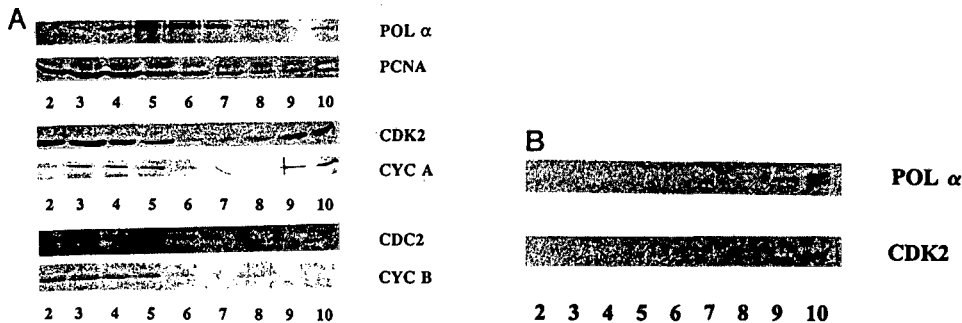


Fig. 2. Sucrose density gradient centrifugation. A) Nuclear extracts were layered onto a 10-40% sucrose density gradient and then centrifuged as described under Materials and Methods. Ten fractions were collected from the top (fraction 1) to the bottom (fraction 10) of the tubes. The fractions 2-10 were then subjected to western blotting using antibodies against DNA polymerase α (POL α), PCNA, cdk2, cyclin A (CYC A), cdc2, and cyclin B (CYC B). B) Fractions 9 and 10 from the first gradient were incubated with a mixture of DNase I and RNase A as described under Materials and Methods and then layered onto a second linear gradient of 10-40% sucrose. Ten fractions were collected and fractions 2-10 subjected to western blotting using antibodies against DNA polymerase α (POL α) or cdk2.

complexes, behaved similarly to cdk2, being associated with the nuclear matrix fractions. Thus, two pools of cdk2 were present in the nuclei of HeLa cells, one sensitive to nucleases and the other one bound to the nuclear matrix.

To characterize cyclin/cdk complexes in the nucleus of HeLa cells, nuclear extracts were analyzed by 10-40% sucrose density gradients. This type of gradients was previously employed for the isolation of replisome complexes from chinese hamster fibroblasts and calf thymus cells (12). After centrifugation, we collected ten fractions which were analyzed by western blotting by using antibodies against cdk2, cdc2, cyclin A and cyclin B. Antibodies against DNA polymerase α and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were used as markers of the replisome complexes. Figure 2A shows that DNA polymerase α and PCNA exhibit two peaks in the gradient. The first one, corresponding to the soluble form of these proteins or to small complexes, was found in fractions 4 to 7 for DNA polymerase α and in fractions 1 to 7 for PCNA. The second peak, corresponding to the replisome complex was detected in the last fraction (number 10) as described elsewhere (12). Cdk2 and cyclin A also showed two peaks in the gradients, the first one in fractions 2 to 5 and the second one in fractions 9 and 10. In contrast, cdc2 and cyclin B showed only one peak in fractions 2 to 5 although small amounts of these proteins could be observed in fractions 9 and 10.

Fractions 9 and 10 were mixed and subjected to a digestion with DNase I and RNase A as described under Materials and Methods, in order to disrupt the aggregates associated with DNA or RNA. After digestion, the samples were loaded onto a second linear gradient (10-40%) of sucrose. The fractions obtained from the second gradient were analyzed by western blotting. As it can be observed in figure 2B, DNA polymerase α and also cdk2 were still forming large aggregates which migrate to fractions 9 and 10. To demonstrate that the complexes found in fraction 10, which corresponds to the bottom of the tube, were not simply

non-specific precipitates, experiments using 20-60% sucrose gradients were carried out. The fractions obtained using these gradients were analyzed by western blotting. Results indicate that the peak of cdk2 and DNA polymerase α , were found in fractions 8 and 9 that are resolved from the bottom of the tube (data not shown). This observation indicates that these complexes actually exist and do not represent non-specific precipitates.

In order to test which fractions of the nuclear cyclin/cdk2 complexes display kinase activity, we immunoprecipitated the fractions of a 20-60% sucrose gradient with antibodies against cdk2 and then the immunoprecipitates were analyzed for their histone H1-kinase activity. As it can be seen in figure 3 two peaks of activity were found. The first peak in fractions 1 to 5 and the second one in fraction 9, indicating that both small and large cyclin/cdk2 complexes contain active cdk2. Immunoprecipitations with anti-cyclin A antibodies were also carried out. In these experiments two peaks of histone H1-kinase activity, similar to those obtained with anti-cdk2 antibodies, were observed (fig. 3). Although cyclin A could form complexes with cdk2 and cdc2, the finding that cdc2 was not present in the last fractions of the tube (figure 2A) indicate that cdk2 is associated with cyclin A in the large aggregates. However, the existence of cyclin A/cdc2 complexes in fractions 1 to 5 and the presence of cyclin E/cdk2 complexes in the different fractions can not be excluded.

The presence of putative nuclear substrates of cdk2 was also analyzed by immunoprecipitation followed by phosphorylation assays. The immunoprecipitates obtained with anti-cdk2 antibodies were analyzed for their kinase activity in the presence or absence of histone H1. Immunoprecipitations using a normal rabbit serum were carried out as a control. As shown in figure 4, in the presence of histone H1 three bands were specifically phosphorylated, a doublet of 35 kDa, corresponding to histone H1, and another band with Mr of 18 kDa. In the absence of histone H1, the band of 18 kDa was still specifically phosphorylated. These results indicate that the 18 kDa protein is a specific cdk2 associated protein which is a candidate for cdk2 nuclear substrate.

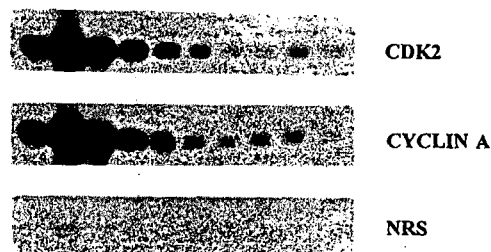


Fig. 3. Histone H1-kinase activity in the fractions from the sucrose density gradients. Nuclear extracts were layered onto a 20-60% sucrose density gradient and then centrifuged as described under Materials and Methods. Ten fractions were collected from the top (fraction 1) to the bottom (fraction 10) of the tubes. The fractions were then immunoprecipitated with antibodies against cdk2, cyclin A or with a normal rabbit serum which was used as a control. The immunoprecipitates were then assayed for histone H1-kinase activity as described under Materials and Methods.

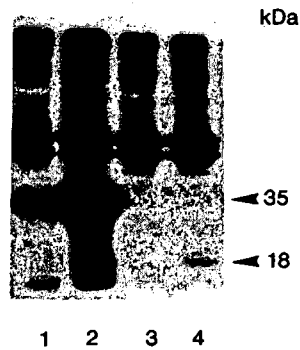


Fig. 4. Identification of associated nuclear protein substrates of cdk2. Nuclear extracts prepared as described under Materials and Methods were immunoprecipitated with antibodies against cdk2 (lanes 2 and 4) or with a normal rabbit serum (lanes 1 and 3) which was used as a control. The immunoprecipitates were then phosphorylated with ^{32}P -ATP in the presence (lanes 1 and 2) or absence (lanes 3 and 4) of histone H1. The arrowheads indicate the Mr of histone H1 (35 kDa) and a 18 kDa protein phosphorylated by cdk2-containing complexes.

DISCUSSION

We report here that cdk2, cdc2 and cyclins A and B can be partially extracted from the nucleus of HeLa cells by incubation with DNase I, RNase A, or with a mixture of both nucleases. These results indicate that a fraction of cyclins and cdks are located at sites sensitive to both nucleases. These treatments mainly release from the nuclei the proteins associated with the hnRNA located at the transcription sites or with the hnribonucleoparticles (13). Thus, the results reported here suggest that both cdks and cyclins can be present in, or in the neighbourhood of, the transcriptionally active chromatin and in consequence they could be involved in transcription and/or RNA processing. Recent reports show that cdk2 and cyclin A associate to E2F (14,15) a transcription factor involved in the expression of G1/S genes (16). Thus, it could be possible that the pool of cdk2 and cyclin A which can be released from the nuclei by nucleases could be associated with transcription factors and located at the transcriptional sites. This possibility is under investigation in our laboratory. The finding that DNA polymerase α is released by nucleases together with cdks and cyclins suggest that they can also be located at the replication sites.

The fraction of cyclins A and B which remains in the nucleus after nuclease digestion can be totally extracted with high salt containing buffers. In contrast, cdk2 and cdc2 were only partially extracted with NaCl and a fraction of both cdks remain associated to the nuclear matrix after extraction. These results indicate that a certain amount of cdks (cdk2 and cdc2) is tightly bound to the nuclear matrix, whereas their cyclin partners may be associated with these cdks in a way that can be extracted with high salt. These results reveal the existence of two intranuclear pools of cdks, one associated with DNA- or RNA-containing structures which is sensitive to the action of nucleases, and another one associated with the nuclear matrix and non sensitive to nucleases.

The sucrose density gradient experiments indicate that at least a fraction of cdk2 forms complexes with nuclear components. These complexes migrate to the bottom of the centrifugation tube and are resistant to the action of nucleases. These experiments also indicate that cyclin A and cdk2, but not cdc2 and cyclin B, co-migrate with the fractions containing the replitase complexes (12), suggesting that cdk2 but not cdc2 could be associated to the replitase complexes which contain the replicative machinery. In fact, it has been reported that cyclin A/cdk2 complexes have a role in DNA synthesis (5). Likewise, immunofluorescence experiments reveal that cyclin A and cdk2 co-localize with the replication sites, although the level of resolution of this method is not high enough to be conclusive (17). In contrast, cdc2 does not form large complexes, indicating that this kinase does not participate in the same type of aggregates than cdk2. Since vertebrate cdc2 is not involved in DNA replication but in mitosis (3), its association with the nuclear matrix should be in a location different from the replication sites, possibly at the nuclear lamina or nuclear envelope, since cdc2/cyclin B complexes have been implicated in the nuclear envelope breakdown during the G2/M transition (18). However, the possible association of cdc2 with the transcription sites cannot be ruled out.

Nuclear cdk2 complexes are active since they display histone H1 activity as observed by immunoprecipitation with anti-cdk2 antibodies. At least a portion of these complexes contain cyclin A as demonstrated by immunoprecipitation with anti-cyclin A antibodies. In addition, cyclin/cdk2 complexes also contain a protein of 18 kDa which is phosphorylated by cdk2. The Mr of this protein do not correspond to any of the possible cdk2 substrates identified until now. Thus, this protein appears as a new candidate protein for being a nuclear substrate for cdk2 containing complexes. The identity of this protein is under investigation in our laboratories.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financially supported by the grants SAL91-765, SAL91-968 and SAF93-109 from the Comisión interministerial de Ciencia y Tecnología and W.W. Smith Charitable trust, Milheim Foundation and RO1 CA 60999-01A1. Montserrat Jaumot is a FPI fellowship recipient from the Ministerio de Educación y Ciencia. Xavier Graña was supported by a postdoctoral fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT) de la Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

1. Pines, J. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 144-1482.
2. Nigg, E.A. (1993) *Trends Cell Biol.* 3, 296-301.
3. Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) *Nature* 327, 31-35.
4. Sherr, C.J. (1993) *Cell* 73, 1059-1065.
5. Reed S.I. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 529-561.
6. Hunter, T. and Pines, J. (1991) *Cell* 66, 1071-1074.

7. Carbonaro-Hall, D., Williams, R., Wu, L., Warburton, D., Zeichner-David, M., MacDougall, M., Tolo, V., and Hall, F. (1993) *Oncogen* 8, 1649-1659.
8. Castro, A., Jaumot, M., Vergés, M., Agell, N. and Bachs, O. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
9. Colomer, J., Agell, N., Engel, P., Alberola-Ila, J., and Bachs, O. (1993) *Cell Calcium* 14, 609-618.
10. Kaufmann, S.H., and Shaper, J.H. (1984) *Exp. Cell. Res.* 155, 477-495.
11. Graña, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P.P., Rossenblat, J., Morgan, D.O. and Giordano, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3834-3838.
12. Noguchi, H., Reddy, G.P.V., and Pardee, A.B. (1983) *Cell* 32, 443-451.
13. Bosser, R., Roig, J, Itarte, E. and Bachs, O. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
14. Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I., and Hartlow, E. (1992) *Genes and Dev.* 6, 1874-1885.
15. Devoto, S.H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter T., and Nevins, J.R. (1992) *Cell* 68, 167-176.
16. Dou, Q.P., Zhao, S., Levin, A.H., Wang, J., Helin, K. and Pardee, A.B. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1306-1313.
17. Cardoso, M.C., Leonhardt, H., and Nadal-Ginard, B. (1993) *Cell* 74, 979-992.
18. Nigg, E.A. (1992) *Semin. Cell Biol.* 3, 245-253.

Fig 1.

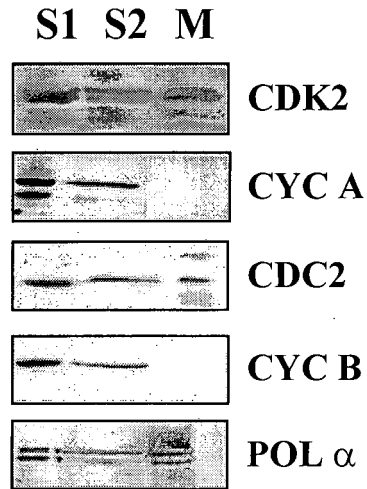


Fig 2.

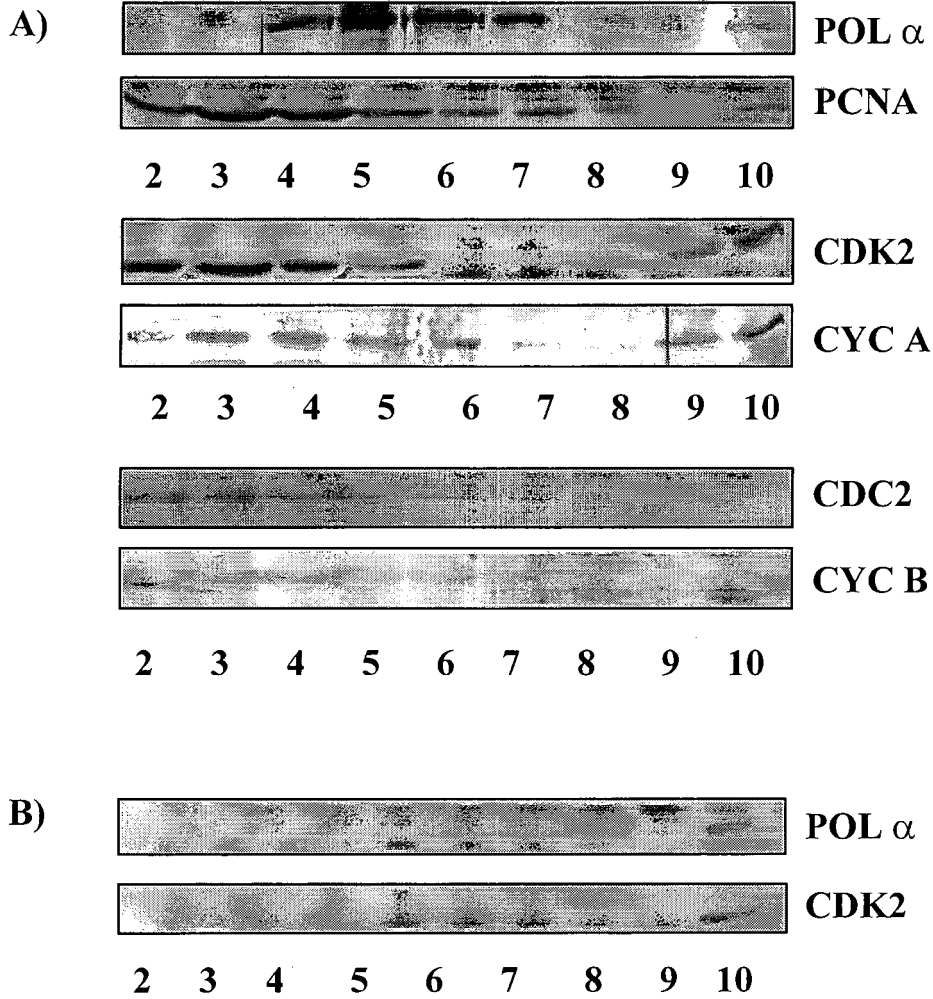


Fig 3.

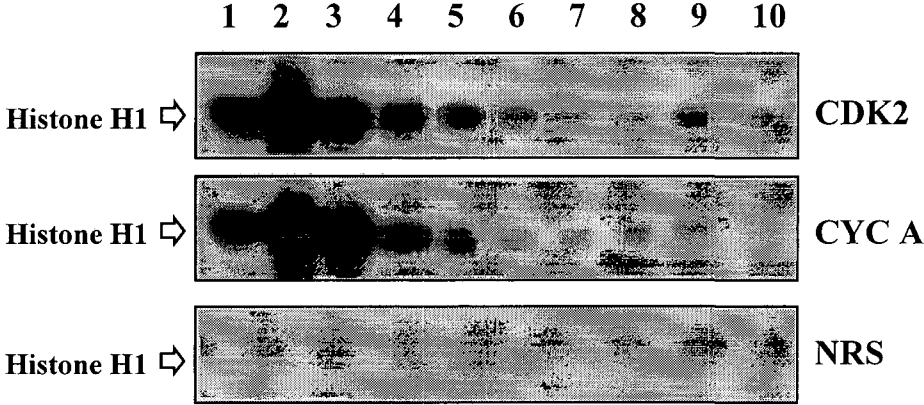
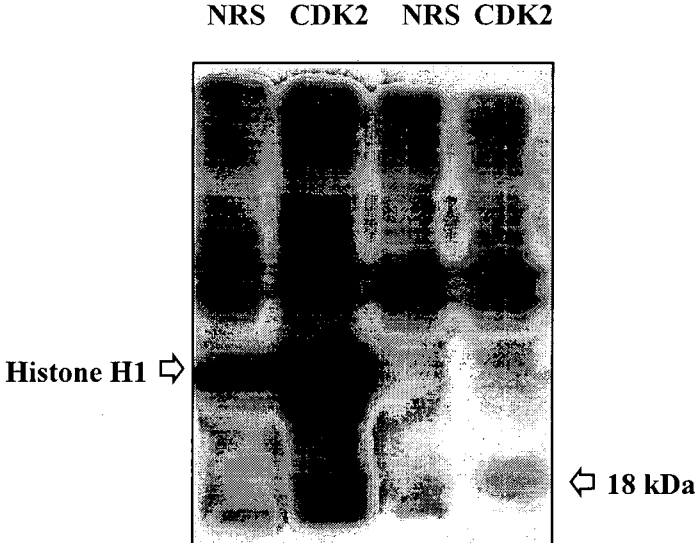


Fig 4.



LOCALITZACIÓ SUBNUCLEAR DE PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL CICLE CEL.LULAR I LA REPLICACIÓ DEL DNA.

Annex I

Objectiu:

L'objectiu d'aquest annex és complementar els resultats exposats a l'article 1 en referència a la distribució diferencial en el nucli d'algunes proteïnes relacionades amb el cicle cel.lular i la replicació del DNA.

Introducció:

Les proteïnes reguladores del cicle cel.lular i les proteïnes involucrades en la replicació del DNA realitzen les seves funcions en el nucli (encara que existeixen evidències experimentals que demostren que algunes d'aquestes proteïnes també estan presents en altres compartiments cel.lulars com veurem més endavant). Dins el nucli, aquestes proteïnes també estan distribuïdes diferencialment segons el procés en el qual participen. Vem considerar interessant doncs, localitzar intranuclearment algunes d'aquestes proteïnes.

Material i Mètodes:

Aïllament de nuclis: Es resuspenen els *pellets* de cèl.lules en tampó RSB (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM NaCl i 3 mM MgCl₂) més els inhibidors de proteases corresponents (1 mM PMSF, 0,5 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml d'inhibidor de la tripsina i 10 µg/ml de N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (Sigma)) a una densitat de 10⁷ cèl.lules/ml. Seguidament, s'afegeix gota a gota Nonidet P-40 a una concentració final del 0,5% a partir d'un *stock* concentrat i les mostres s'agiten amb el vòrtex durant 20 segons. Tot seguit, es centrifuga la barreja a 650 x g durant 15 minuts, i el *pellet* es torna a resuspendre en el tampó RSB més

Nonidet P-40, agitació i centrifugació novament. Finalment es realitzen dos rentats dels nuclis amb tampó RSB sense addicionar el detergent i es resuspenen amb el tampó isotònic STM (250 mM sucrosa, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) i 5 mM MgSO₄) que conté 1 mM PMSF.

Subfraccionament nuclear: El mètode de subfraccionament nuclear utilitzat per l'anàlisi va ser el descrit per Kaufmann i Shaper l'any 1984. Resumit, s'incuben els nuclis purificats segons l'apartat anterior amb una barreja de nucleases (RNasa A i DNasa I) a una concentració de 250 µg/ml cada una, durant una hora i a 4°C. Seguidament, es sedimenten els nuclis a 800 x g durant 10 minuts. La fracció soluble al tractament amb les nucleases s'anomena S1. A continuació, els nuclis es resuspenen en tampó LS (10 mM Tris-HCl (pH 7,4) i 0,2 mM MgSO₄) amb 1 mM de PMSF. Tot seguit s'afegeix gota a gota tampó HS (2 M NaCl en tampó LS) amb 1 mM PMSF fins aconseguir una concentració final de 1,6 M de NaCl i es deixa agitant en el vòrtex a 4°C durant 15 minuts. A continuació es centrifuga a 500 x g durant 20 minuts i la fracció soluble que s'obté rep el nom de S2. Es repeteix la darrera extracció una vegada i l'estructura insoluble que s'obté correspon a la matriu nuclear.

Electroforesi i immunoblot: Les subfraccions nuclears es van separar electroforèticament per SDS-PAGE segons Laemmli (1970). Els gels es van transferir a membranes de Immobilon-P (Millipore) en el tampó 25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glicina, 20 % metanol i 0,02 % SDS. Les membranes es van preincubar en tampó TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 150 mM NaCl) amb 5% de llet en pols a temperatura ambient durant 1 hora. Posteriorment, es va realitzar la incubació amb l'anticòs corresponent en TBS-0,5 % de llet en pols-1 % d'albumina bovina (BSA) a temperatura ambient durant 1 hora. Després de realitzar tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb TBS-0,05% Tween 20, les membranes es van incubar amb el segon anticòs conjugat amb fosfatasa alcalina de Promega (dilució 1:10000) durant 45 minuts a temperatura ambient. Després de tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb TBS-0,05% Tween 20 i un amb TBS, es va visualitzar la reacció amb NBT i BCIP de Promega.

Taula A: Anticossos utilitzats en aquest treball.

Anticòs	Dilució	Especificitat	Casa comercial
cdk2	1:500	Conill, policlonal	UBI
cdc2	1:100	Conill, policlonal	UBI
cdk4	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
ciclina A	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
ciclina B	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
ciclina D	1:500	Conill, policlonal	UBI
Rb	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
p21	1:100	Cabra, policlonal	Santa Cruz
p27	1:1000	Conill, policlonal	Massagué
p16	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
p15	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
DNA POL	1:100	Conill, policlonal	Santa Cruz
PCNA	1:100	Ratolí, monoclonal	Boehringer
RPA (subunitat 70 kDa)	1:100	Ratolí, monoclonal	Hubscher (Zúric)
P1 MCM3	1:3000	Conill, policlonal	Kimura (Japó)
cdc21	1:3000	Conill, policlonal	Kimura (Japó)

Abreviatures: Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; UBI, Upstate Biotechnology.

Resultats:

Es van analitzar 16 proteïnes que es van subdividir en dos blocs segons la seva funcionalitat: les proteïnes relacionades directament amb el control del cicle cel.lular, i les proteïnes involucrades amb la replicació del DNA.

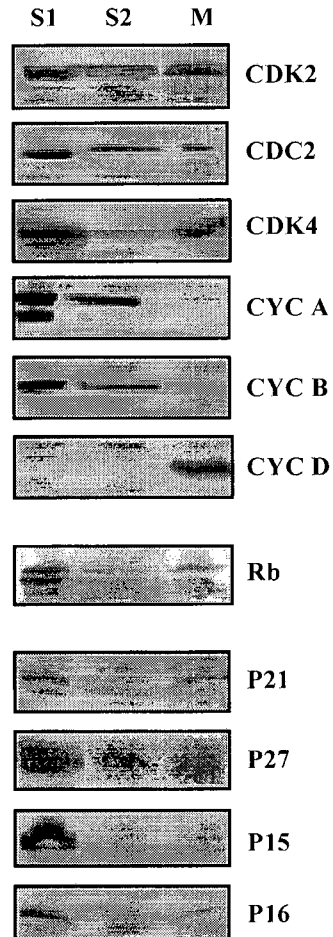


Fig A. Localització de proteïnes reguladores del cicle cel.lular en les diferents subfraccions nuclears de cèl.lules HeLa.

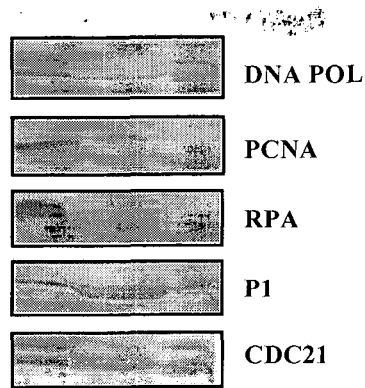


Fig B. Localització de proteïnes relacionades amb la replicació del DNA en les diferents subfraccions nuclears de cèl.lules HeLa.

Proteïnes extretes a la S1.	Proteïnes extretes a la S2.	Proteïnes presents a matriu nuclear.
cdk2, cdc2, cdk4, cyc A, cyc B, pRb, p21, p27, p15, p16, DNA pol, i PCNA.	Cdk2, cdc2, cdk4, cyc A, cyc B, pRb, p27, p15, p16, DNA pol α i PCNA.	cdk2, cdc2, cdk4, ciclina D, pRb, p21, p16, DNA pol α , P1, i cdc21.

Taula B. Proteïnes extretes amb cada un dels tractaments de solubilització durant el subfraccionament nuclear.

CARACTERITZACIÓ DELS GRADIENTS DE DENSITAT DE SUCROSA.

Annex 2

Objectiu:

L'objectiu d'aquest annex és complementar els resultats obtinguts en l'anàlisi dels gradients de densitat de sucrosa presentats a l'article 1.

Introducció:

Per estudiar els complexos que formen les proteïnes entre si, o bé, per trobar noves associacions entre proteïnes, existeixen varies aproximacions experimentals: entre elles podríem destacar els assajos d'immunoprecipitació amb anticossos específics contra una de les proteïnes del complex; l'estudi mitjançant columnes cromatogràfiques d'afinitat de la proteïna analitzada; l'anàlisi de complexos amb gradients de densitat, etc.

En aquest treball, amb la finalitat d'estudiar els complexos que formen les proteïnes reguladores de cicle cdk2, ciclina A, cdc2 i ciclina B, es van utilitzar gradients de densitat continus de sucrosa. A l'hora d'escollir el tipus de gradient es van tenir en compte els resultats obtinguts per Reddy i Pardee (1980) els quals amb el seu gradient aconseguien aïllar els anomenats complexos replitasa, uns macrocomplexos que contenen l'activitat enzimàtica de diversos precursors de la síntesi del DNA i dels dNTP. Vam pensar que possiblement, les proteïnes cdk2 i ciclina A, responsables de la progressió de la fase S, podrien colocalitzar amb els complexos obtinguts per Reddy i Pardee.

Material i Mètodes:

Tal com està descrit a l'apartat de Materials i Mètodes de l'article es van utilitzar dos tipus de gradients: del 10 % al 40 % (coixí del 66%) de sucrosa i del 20 al 60 % de sucrosa (coixí del 90%). Els resultats exposats a l'article corresponen als

gradients del 10 al 40 %. En aquest annex s'exposen els resultats obtinguts amb els gradients del 20 al 60 % de sucrosa per tal de complementar els anteriors; i un estudi dels pesos moleculars aproximats que tenen les proteïnes o complexos que es resolten en cada una de les fraccions dels gradients en els dos casos.

Estudi dels pesos moleculars amb un marcador comercial.

Es va utilitzar el marcador *Protein Standard for Size Exclusion Chromatography* de BioRad (Cat. 151-1901) compost per les següents proteïnes de pes molecular conegut:

Tiroglobulina, 5 mg	670,000 kDa
Gamma globulina bovina, 5mg	158,000 kDa
Ovalbumina de pollastre, 5 mg	44,000 kDa
Mioglobina equina, 2,5 mg	17,000 kDa
Vitamina B-12, 0.5 mg	1,350 kDa

Es carreguen 6 µl del marcador en cada un dels gradients, es centrifuguen durant 5 hores a 35.000 rpm a 4°C (rotor SW 50.1 de Beckmann) i es resolten en fraccions de 500 µl. Les fraccions es precipiten amb 10% d'àcid tricloracètic (TCA) i es realitzen les electroforesis (SDS-PAGE) amb gels del 10% de poliacrilamida. Els gels es tenyeixen amb Blau de Comassie (0,25% Comassie Blue G-250, 45 % metanol i 10 % àcid acètic) durant 10 min, i seguidament es destenyeixen amb el tampó destenydor (5% metanol i 7,5 % d'àcid acètic) fins la correcte visualització de les bandes.

Resultats:

Estudi dels pesos moleculars amb un marcador comercial:

El marcador més gran de pes molecular del qual disposem és la tiroglobulina de 670 kDa.. En el gradient del 10% al 40% de sacarosa aquesta proteïna apareix fins la fracció 6, i en el gradient del 20% al 60% de sacarosa fins la fracció 4. Per tant, podem concloure que a partir de la fracció 6 del gradient més curt i de la fracció 4 del

gradient llarg els complexos que s'obtenen sobrepassen el pes molecular de la tiroglobulina de 670 kDa.

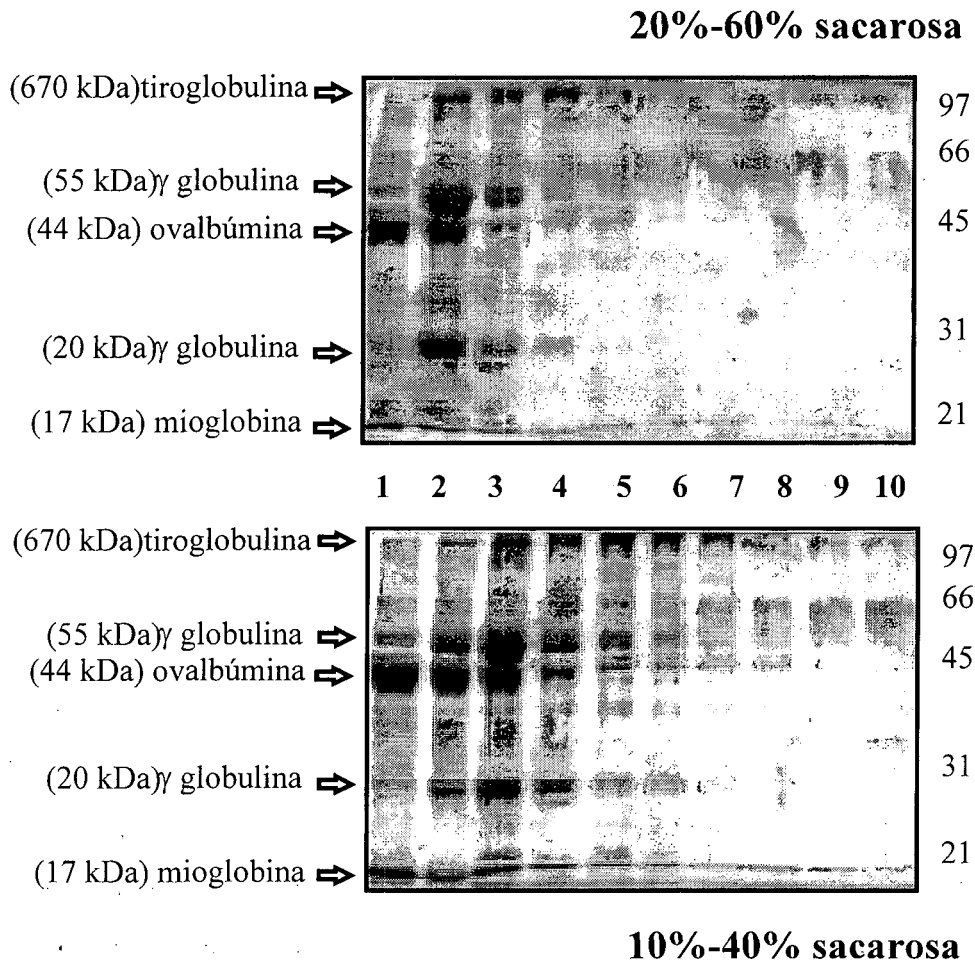


Fig A. Resolució d'un marcador comercial en els gradients del 20% al 60% de sucrosa i del 10% al 40 % de sucrosa.

Determinació de la DNA pol α , PCNA, cdk2 i ciclina A en els gradients del 20 al 60% de sacarosa:

Tal com es descriu a l'article, la DNA polimerasa α , el PCNA, la cdk2 i la ciclina A es distribueixen en dos pics en el gradient del 10% al 40% de sucrosa; el primer correspon a les formes solubles o bé a petits complexos i el segon a complexos

grans. Aquest segon pic coincideix amb l'última fracció del gradient. Amb l'objectiu de descartar que els resultats obtinguts amb els gradients del 10% al 40% de sacarosa no eren deguts a la formació d'agregats que precipitaven el el fons del tub, es van realitzar els gradients més amples del 20 al 60% de sacarosa per tal de comprovar si aquest segon pic retrocedia.

Els resultats obtinguts demostraven aquesta hipòtesi, el segon pic de cdk2 i de ciclina A es movia cap a la fracció 8/9 del gradient del 20 al 60% de sacarosa; i com es pot evidenciar a la fig. C (corresponent a la figura 3 de l'article 1), també l'activitat quinasa associada a aquests complexos grans se situa a les fraccions esmentades.

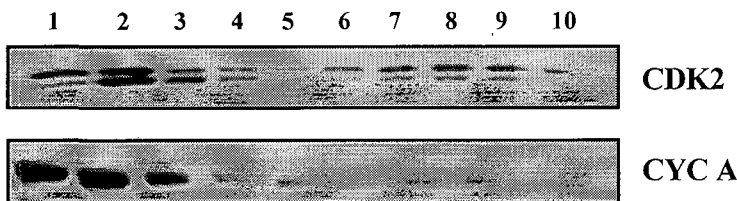


Fig B. Anàlisi per immunoblot amb anticossos anti-cdk2 i ciclina A de les fraccions obtingudes amb el gradient del 20% al 60% de sacarosa.

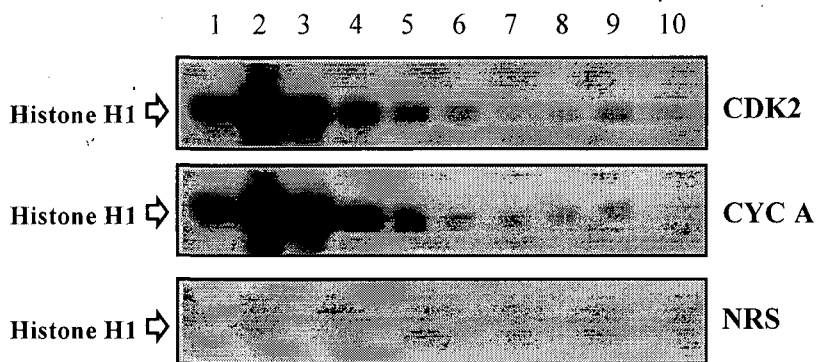


Fig C. Activitat quinasa associada a la histona H1 dels complexos cdk2 i ciclina A en les fraccions obtingudes del gradient del 20% al 60% de sucrosa.

ESTUDI DELS COMPLEXES CDK2, CICLINA A I P21 EN CÈL.LULES HELA.

Annex 3

Objectiu:

L'objectiu d'aquest annex és identificar noves proteïnes associades als complexos cdk2, ciclina A i p21 en cèl.lules HeLa.

Introducció:

La recerca de proteïnes associades als complexos que formen les proteïnes reguladores del cicle cel.lular, pot obrir noves perspectives a l'hora de comprendre el funcionament general del cicle cel.lular.

Material i Mètodes:

Marcatge metabòlic de cèl.lules HeLa amb metionina-S³⁵: es replanten les cèl.lules en plaques de 100 mm i s'espera fins que arriben a una confluència del 80%. Cinc hores abans de la recollida de la mostra, el medi de cultiu és substituït per medi sense metionina al qual se li afegeix 1mCi de ³⁵S-metionina (Amersham AG 1094, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, Redivue) per placa. Després de rentar 3 vegades amb PBS les cèl.lules es recullen i es congelen a -80°C.

Immunoprecipitació: Els pellets de cèl.lules congelats es lisen amb tampó IP (50 mM Tris-HCl ph 7.4, 0,1% Tritó X-100, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1mM PMSF i 10 µg/ml de leupeptina) durant 30 minuts a 4°C. La fracció soluble s'obté per centrifugació a 10000 x g durant 10 minuts. Els sobrenadants s'incuben amb 25 µl de sèrum normal de conill per 1500 µg de proteïna total durant 30 minuts a 4°C i seguidament, amb 40 µl de proteïna A-Sepharosa. La barreja es centrifuga a 10000 x g durant 10 minuts i es separa acuradament el sobrenadant. Aquest es sotmet a la immunoprecipitació pròpiament dita incubant-lo

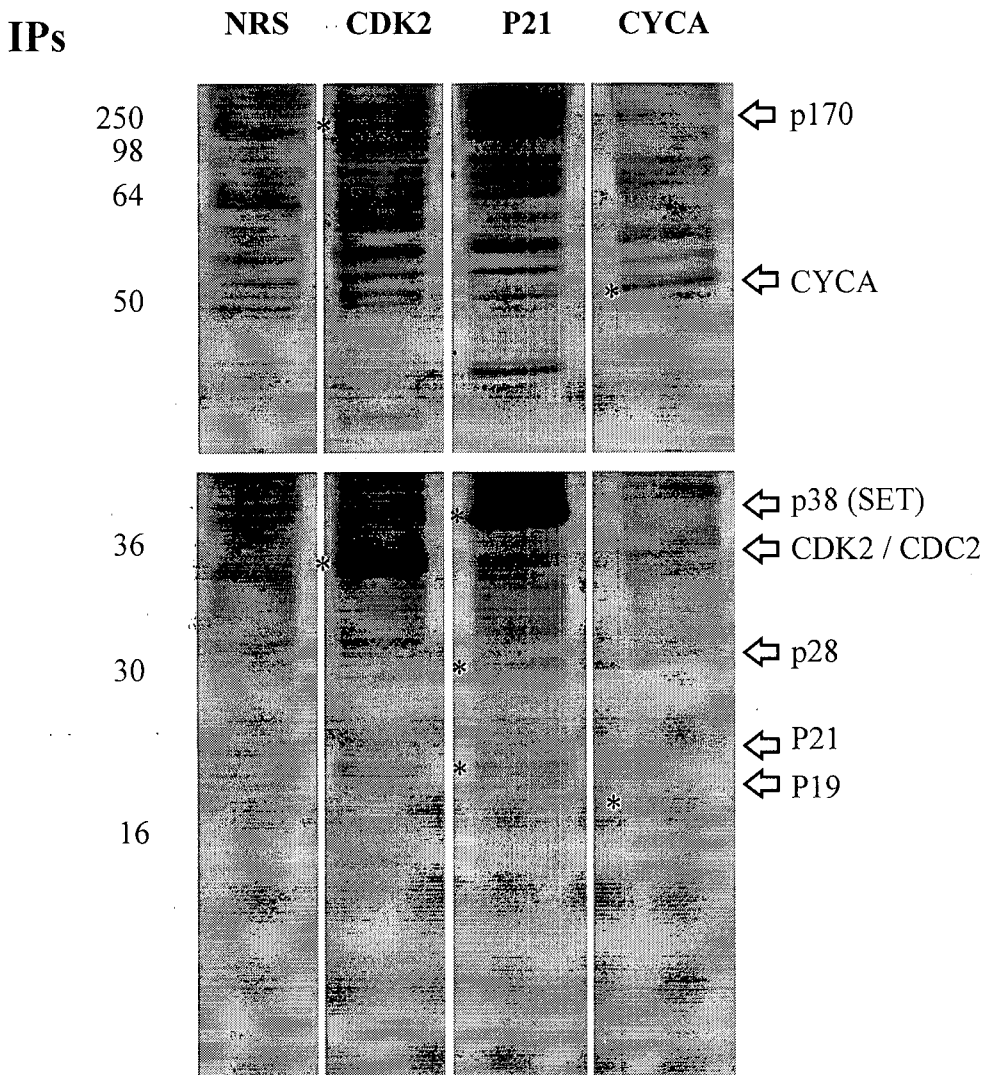


Fig. A i B Immunoprecipitacions de lisats totals de cèl.lules HeLa marcades metabòlicament amb metionina- S^{35} . Els anticossos utilitzats van ser anti cdk2, anti ciclina A, anti p21 i sèrum normal de conill. Les dues figures pertanyen al mateig gel exposat diferents temps en un film autorradiogràfic.

amb els anticossos anti cdk2, anti ciclina A o anti p21 durant 1 hora a 4°C i seguidament amb proteïna A-Sepharosa a les mateixes condicions. Finalment, es fan tres rentats amb tampó IP i s'afegeixen $35\mu\text{l}$ de 2x tampó de mostres de Laemmli. Les mostres es bullen i és resolen electroforèticament en gels de poliacrilamida. Els gels es tracten amb tampó destenydor (5 % metanol i 7,5 % d'àcid acètic) durant 20

min, amb *dimethylsulfoxid* (DMSO) durant 1 hora, DMSO + 22 % (PPO) durant 1 hora i finalment es fan tres rentats de 15 min amb aigua. Seguidament, els gels s'assequen i s'exposen amb un film per visualitzar les bandes per autorradiografia.

Resultats:

Es va córrer un gel de poliacrilamida del 15%. Una vegada assecat el gel es va exposar en un film autorradiogràfic durant 4 dies (Fig. A) o durant 8 dies (Fig. B). La figura A pertany a la part superior del gel i la figura B a la part inferior.

Analitzant la immunoprecipitació amb anticossos anti cdk2, s'observa que la ciclina A i la p21 formen part dels complexos tal com s'esperava. Adicionalment, es detecta una proteïna de 170 kDa encara no identificada.

Els complexos que forma la p21 contenen cdk2 i ciclina A, a més de dues proteïnes de 38 kDa i 28 kDa no descrites fins el moment. La proteïna de 38 kDa ha estat recentment identificada com a un inhibidor de la família de les fosfatases PP2A anomenada SET (Estañol, 1997 en preparació). La proteïna de 28 kDa encara no ha estat identificada.

Les proteïnes que s'associen a la ciclina A són la cdk2, la p21 i la p19, totes elles ja descrites a la bibliografia.

Com a conclusió d'aquest experiment podem dir que en lisats totals de cèl.lules HeLa, els complexos que formen les proteïnes analitzades contenen les proteïnes esperades, més tres proteïnes no descrites fins el moment de 170 kDa, 28kDa i 38 kDa.

IDENTIFICACIÓ DE SUBSTRATS NUCLEARS DE CDK2.

Annex 4

Objectiu:

L'objectiu d'aquest annex és complementar els resultats exposats a l'article 1 en referència a la identificació de nous substrats nuclears de cdk2.

Introducció:

Les cdk2 juguen un paper essencial en la progressió de cada una de les fases del cicle cel.lular, però malgrat tot, el nombre de substrats coneguts d'aquestes quinases encara és molt limitat. Tal com hem vist a la introducció, la cdk2 és la cdk de la qual més proteïnes diana es coneixen; vam considerar interessant doncs, centrar els nostres esforços en la identificació de nous substrats de la cdk2, enzim responsable de la transició G1/S i de la fase S.

Material i Mètodes:

El mètode experimental utilitzat en aquest treball han estat els assajos de immunoprecipitació amb anticossos específics contra la cdk2. D'aquesta forma s'obté la quinasa més les proteïnes associades, entre les quals, possiblement hi hagi algun substrat. Per tal de demostrar aquesta hipòtesi s'han realitzat assajos de fosforilació en els immunoprecipitats amb γ -ATP-P³² i sense afegir cap substrat exogen a la reacció.

Una vegada identificades les bandes fosforilades en aquests immunoprecipitats mitjançant SDS-PAGE més autorradiografia del gel, es va comprovar si aquestes proteïnes es podien també detectar en immunoprecipitats de cdk2 realitzats amb mostres obtingudes de cèl.lules marcades metabòlicament amb metionina-S³⁵.

Immunoprecipitació: Les mostres d'extractes nuclears obtinguts segons es descriu a l'apartat de Materials i Mètodes de l'article 1 es dilueixen amb el tampó IP (50 mM Tris-HCl ph 7.4, 0,1% Tritó X-100, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM

NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1mM PMSF i 10 µg/ml de leupeptina) durant 30 minuts a 4°C. La fracció soluble s'obté per centrifugació a 10000 x g durant 10 minuts. Els sobrenadants s'incuben amb 25 µl de sèrum normal de conill per 1500 µg de proteïna total durant 30 minuts a 4°C i seguidament, amb 1 mL de SAC (*Staphylococcus aureus* Colan) per cada 25 µl de sèrum normal de conill. la barreja es centrifuga a 10000 x g durant 10 minuts i es separa acuradament el sobrenadant. Aquest es sotmet a la immunoprecipitació pròpiament dita incubant-lo amb els anticossos anti cdk2 durant 1 hora a 4°C i seguidament amb proteïna A-Sepharosa a les mateixes condicions.

Assaig de l'activitat quinasa associada a la histona H1: Els immunoprecipitats s'incuben a 30°C durant 20 minuts amb el tampó quinasa (20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgAc, 1 mM DTT), 1 µg de histona H1 (Boehringer Mannheim, Alemanya), 20 µM ATP i 10 µCi de γ-³²P ATP (Amersham, 3000 Ci/mmol) en un volum total de 25 µl. Després d'afegir 35 µl de 2x tampó de mostres de Laemmli (0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-β-mercaptoetanol, 0,006% blau de bromofenol) les mostres es bullen i és resolen electroforèticament en gels de poliacrilamida del 10%. Els gels s'assequen i s'exposen amb un film per visualitzar les bandes per autorradiografia.

Assaig de l'activitat quinasa associada a substrats immunoprecipitats: Els immunoprecipitats s'incuben a 30°C durant 20 minuts amb el tampó quinasa (20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgAc, 1 mM DTT), 20 µM ATP i 10 µCi de γ-³²P ATP (Amersham, 3000 Ci/mmol) en un volum total de 25 µl. Després afegir 35 µl de 2x tampó de mostres de Laemmli, les mostres es bullen i és resolen electroforèticament en gels de poliacrilamida. Els gels s'assequen i s'exposen amb un film per visualitzar les bandes per autorradiografia.

Marcatge metabòlic de cèl.lules HeLa amb metionina-S³⁵: es replanten les cèl.lules en plaques de 100 mm i s'espera fins que arriben a una confluència del 80%. Cinc hores abans de la recollida de la mostra, el medi de cultiu és substituït per medi sense metionina al qual se li afegeix 1mCi de ³⁵S-metionina (Amersham AG 1094,

370 MBq/ml, 10 mCi/ml, Redivue) per placa. Després de rentar 3 vegades amb PBS les cèl.lules es lisen amb el tampó IP i es procedeix a la immunoprecipitació normalment. S'afegeixen 35µl de 2x tampó de mostres de Laemmli, les mostres es bullen i és resolen electroforèticament en gels de poliacrilamida. Els gels es tracten amb tampó destenydor (5 % metanol i 7,5 % d'àcid acètic) durant 20 min, amb *dimethylsulfoxid* (DMSO) durant 1 hora, DMSO + 22 % PPO durant 1 hora i finalment es fan tres rentats de 15 min amb aigua. Seguidament, els gels s'assequen i s'exposen amb un film per visualitzar les bandes per autorradiografia.

Resultats:

Es van córrer en primer lloc, gels de poliacrilamida del 15% per tal de detectar proteïnes fosforilades de baix pes molecular. Els resultats (Fig. A) van ser que a més de la proteïna de 18-21 kDa que es presenta a la figura 4 de l'article, una altre proteïna de 170 kDa també es fosforila específicament en els immunoprecipitats.

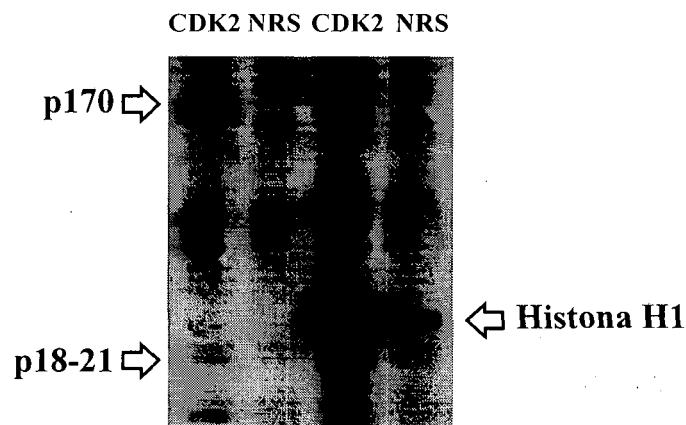


Fig. A. Identificació de substrats nuclears de cdk2. Es van realitzar immunoprecipitacions amb extractes nuclears de HeLa amb anticossos contra cdk2 i amb un sèrum normal de conill com a control. Els immunoprecipitats es van fosforilar amb ATP-P³² amb presència i absència de histona H1. Autorradiografia d'un gel del 15% de poliacrilamida.

El pas següent va estar repetir el mateix experiment, però realitzant les electroforesis en gels més llargs i de concentració de poliacrilamida més baixa per tal de resoldre millor les proteïnes d'elevat pes molecular. Paral·lelament als experiments de fosforilació es van dur a terme els experiments de marcatge metabòlic de les proteïnes amb metionina-S³⁵. Les mostres es van immunoprecipitar amb anticossos específics de cdk2 i posteriorment es van resoldre en un gel de les mateixes característiques que l'anterior. Els dos gels es van comparar i es va comprovar que la p170 també es marcava metabòlicament amb metionina-S³⁵.

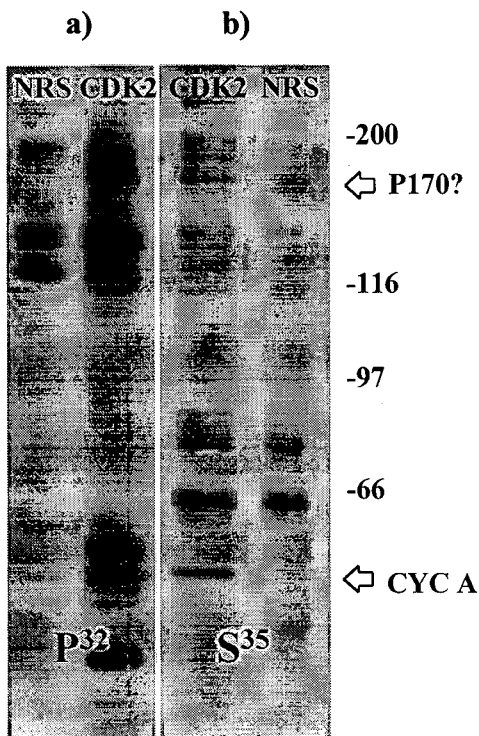


Fig. B a) Immunoprecipitacions amb extractes nuclears de HeLa marcades metabòlicament amb metionina-S³⁵. Els anticossos utilitzats van ser anti-cdk2 i sèrum normal de conill. b) Immunoprecipitacions amb extractes nuclears de HeLa amb anticossos contra cdk2 i amb un sèrum normal de conill. Els immunoprecipitats es van fosforilar amb ATP-P³² en absència de substrat exogen. Autorradiografia d'un gel del 6% de poliacrilamida.

Per tal de descartar que la proteïna fosforilada de 170 kDa no fos la DNA polimerasa α es van realitzar immunoprecipitacions amb anticossos específics contra la proteïna P1. La bibliografia descriu que la proteïna P1 immunoprecipita amb la DNA polimerasa α (Kimura 1994). Paral·lelament es van repetir les immunoprecipitacions amb anticossos anti-cdk2 i amb anticossos control per tal de comparar les bandes.

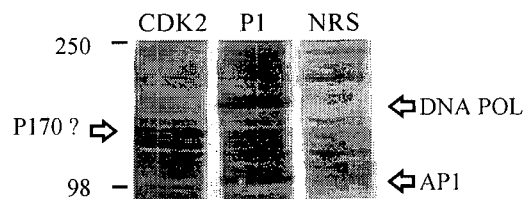


Fig C. Immunocomplexes obtinguts amb anticossos anti-P1, anti-cdk2 i control en mostres nuclears de cèl.lules HeLa marcades amb metionina- S^{35} .

Com a conclusió d'aquests experiments podem dir que al menys dues proteïnes de pesos moleculars de 18-21 kDa i de 170 kDa es fosforilen específicament en els immunocomplexes de cdk2. Aquestes proteïnes també es detecten realitzant els mateixos experiments de immunoprecipitació amb mostres marcades amb metionina- S^{35} . La proteïna fosforilada de 170 kDa no és la DNA polimerasa α .

CAPÍTOL II.

Possibles nous substrats nuclears de cdk2 en cèl.lules normals i transformades.

Resum

La identificació de nous substrats de la quinasa cdk2 és una tasca de gran importància a l'hora de complementar els coneixements actuals sobre els mecanismes de regulació de les fases G1 i S del cicle cel.lular.

En estudis previs, es va evidenciar la presència de dues proteïnes, una de 18-21 kDa i l'altra de 170 kDa que es fosforilaven específicament en immunoprecipitats de cdk2 obtinguts d'extractes nuclears de cèl.lules HeLa. Aquestes proteïnes són bons candidats a ser substrats de cdk2. Degut al fet que les cèl.lules HeLa són una línia transformada, i que hi ha evidències experimentals que demostren que alteracions de la maquinària reguladora de cicle són responsables de la transformació cel.lular; es va considerar interessant ampliar l'estudi inicial de recerca de nous substrats de cdk2 a altres models cel.lulars normals i /o de diferent origen.

Es van escollir per a l'estudi quatre línies cel.lulars, dues normals i dues de transformades. Les línies normals van ésser hepatòcits proliferants de rata, i limfòcits humans activats. Les línies transformades van ser les cèl.lules HeLa i la línia limfoblastoide Namalwa. A la variabilitat de l'origen s'hi va afegir la donada per la sincronització de tots els models en les diferents fases del cicle amb excepció de les cèl.lules Namalwa. Els experiments realitzats en tots els casos van ser immunoprecipitacions amb anticossos anti-cdk2 seguides d'assajos de fosforilació amb ATP-P³², la separació de les proteïnes per SDS-PAGE i autorradigrafia per la detecció de les proteïnes fosforilades. Les mostres utilitzades van ser les subfraccions nuclears S1 procedents del tractament amb nucleases de nuclis purificats de totes les línies estudiades; i en el cas de les mostres de fetge també es va analitzar la subfracció S2 que s'obté després de sotmetre les mostres a concentracions elevades de NaCl.

Dues proteïnes, una de 20-21 kDa i l'altra de 63 kDa es fosforilen en immunoprecipitats amb anticossos anti-cdk2 i anti-ciclina A obtinguts amb mostres de cèl.lules HeLa sincronitzades amb la droga hidroxiurea; la fosforilació incrementa progressivament des de el llindar G1/S fins el G2/M; i la proteïna de 63 kDa no es detecta en mostres procedents de cèl.lules assincròniques.

Quan les mostres s'obtenen de nuclis d'hepatòcits proliferants, 5 proteïnes es fosforilen específicament en els immunoprecipitats de cdk2 en la fracció S1; quan s'analitza la subfracció S2 són 8 proteïnes les que apareixen fosforilades. Cal destacar que aquests possibles nous substrats de cdk2 apareixen només quan les mostres provenen de cèl.lules sincronitzades en la fase S i no abans; i que dues de les proteïnes detectades tenen 20 i 21 kDa de pes molecular.

Els estudis realitzats amb mostres de limfòcits normals activats a proliferar, evidencien la presència de 6 proteïnes fosforilades en la fracció S1 procedent de cèl.lules en fase S ; i de 7 proteïnes fosforilades en les mostres de Namalwa assincròniques. Només 3 (entre elles una de 21 kDa) coincideixen en les dues mostres de limfòcits.

Aquest possibles substrats de cdk2 podrien ser proteïnes relacionades amb la transcripció i processament del RNA, i també proteïnes involucrades amb la síntesi del DNA, degut al fet que són les proteïnes que majoritàriament s'extrauen amb la S1.

Putative Nuclear cdk2 Substrates in Normal and Transformed Cells

Montserrat Jaumot, Neus Agell, and Oriol Bachs

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Casanova 143, 08036-Barcelona, Spain

Received January 4, 1996

The presence of putative substrates of cdk2 in a nuclear fraction obtained by DNase plus RNase extraction (S1 fraction) has been analyzed by immunoprecipitation using specific anti-cdk2 antibodies, followed by phosphorylation assays. S1 nuclear fractions from four different cellular types, two normal (rat hepatocytes and human T lymphocytes) and two transformed (HeLa and Namalwa cells), have been studied. Results indicate that the normal cells share three putative nuclear cdk2 substrates of 21, 37 and 57 kDa. On the other hand, only a substrate of 20 kDa is shared by the two transformed cell lines. On comparing the proliferating normal lymphocytes with the lymphoblastoid cell line Namalwa, it can be observed that they share two proteins of 40 and 70 kDa. © 1996 Academic Press, Inc.

The cell cycle is regulated by cyclin-dependent kinases (cdks) associated with cyclins (1). At the present the cdk family of kinases comprises seven members named cdk1-7 which can associate to different cyclins (cyclins A-H) (1). The regulation of the cell cycle is accomplished by the formation of specific cdk/cyclin complexes at fixed points during the sequential phases of the cycle (2). It is well established that during the early G₁ cyclins of the D group bind to cdk4 and cdk6. Later in G₁ cdk2 associates to cyclin E. This complex is necessary to override the restriction point which commits the cell to progress to the S phase independently of extracellular regulation. To initiate and progress through S phase cdk2 becomes associated to cyclin A. Finally, during G₂ and mitosis cdk1 (cdc2) associates to cyclin A and cyclin B (3). At each point of the cell cycle the specific cdk/cyclin complexes phosphorylate specific substrates which are essential for triggering key events of the cell cycle (4). However, only a few number of substrates of the different cdk/cyclin complexes have been identified (4). Therefore, the detection of putative substrates of this family of kinases is an important aim to be accomplished. Cdk2, the critical enzyme for the transition from G₁ to S phase has a nuclear localization and it has been recently reported that a fraction of cdk2 can be released from purified nuclei with nucleases (DNase or/and RNase), indicating that cdk2 is associated to DNA- and RNA-containing structures (5). Subsequent extraction of nuclei with high salt-containing buffers releases a certain amount of cdk2 whereas a pool of the enzyme still remains associated to the residual nuclear matrix (5). Recently, the presence of putative nuclear substrates of cdk2 has been analyzed by immunoprecipitation followed by phosphorylation assays using total nuclear extracts (5). These experiments led to the identification of a 18-20 kDa nuclear protein which was associated to cdk2 complexes and which was phosphorylated by this kinase in HeLa cells. We have extended here these studies using a nuclear subfraction obtained after extracting the nuclei of different cell types with DNase plus RNase.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and synchronization. HeLa cells were synchronized by serum deprivation and hydroxyurea (HU) treatment according to Ashihara and Baserga (6). Human peripheral blood lymphocytes, highly enriched with T lymphocytes were obtained from buffy coats as described (7). The T lymphocytes were activated by adding Phytohaemagglutinin (PHA) at a final concentration of 90 µg/ml. Quiescent lymphocytes were obtained at time 0 and S-phase cells at 72 h after activation. Namalwa cells were obtained from American Type Culture Collection.

Animals and partial hepatectomies. Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were used for the experiments. Partial hepatectomies were carried out according to Higgings and Anderson by which the median and left lateral lobes of the liver were removed (66% of the liver) (8). Surgery was performed under ether anesthesia and animals were killed at 12 or 24 h after operation.

560

0006-291X/96 \$18.00

Copyright © 1996 by Academic Press, Inc.

All rights of reproduction in any form reserved.

Immunoprecipitation and phosphorylation. The samples were cleared with normal rabbit serum and Protein A beads. After centrifugation the supernatants were incubated with the antibodies for 1 h at 4°C followed by an incubation with Protein A beads for 1 h at 4°C. The immunoprecipitates were washed and phosphorylation assays were carried out in the absence of exogenous substrate as previously described by Graña et al (9).

Preparation of nuclei and nuclear subfractions. Nuclei from HeLa cells and human T lymphocytes were obtained as previously described (7) and nuclei from regenerating hepatocytes according to Kaufmann and Shaper (10). S1 and S2 nuclear fractions were prepared as described by Kaufmann and Shaper (10). Briefly, purified nuclei were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5 μg/ml aprotinin), containing 250 μg/ml DNase I and 250 μg/ml Rnase A. After 1 h of incubation at 4°C, nuclei were sedimented at 800 × g for 10 min. The supernatant was collected and named S1. The pellet was resuspended in buffer B (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM MgSO₄, 1 mM PMSF and 0.5 μg/ml aprotinin). Buffer B containing 2 M NaCl was then slowly added to a final NaCl concentration of 1.6 M. After 15 min incubation, the residual structures were sedimented at 5000 × g for 20 min. The pellet was the nuclear matrix and the supernatant was the S2 fraction.

RESULTS

The presence of putative nuclear substrates of cdk2 in nuclear fractions from HeLa cells was analyzed by immunoprecipitation followed by phosphorylation assays. HeLa cells were synchronized by incubation with HU and samples were collected at time 0 and at 5 and 10 h after HU block release. S1 nuclear fractions were obtained at these different times as described under Material and Methods and then subjected to immunoprecipitation using specific anti-cdk2 antibodies. The phosphorylation of proteins present in the immunoprecipitates were then analyzed as described (5). Immunoprecipitations using a normal rabbit serum were carried out as a control. As shown in fig. 1A, two proteins of 20 and 63 kDa were specifically phosphorylated in the samples immunoprecipitated by anti-cdk2 antibodies. The phosphorylation of the two proteins was progressively increasing from 0 to 10 h after release of HU block (from S to M phases). The phosphorylation of the 20 kDa protein but not that of the 63 kDa was also detected in samples from asynchronously growing cells although the intensity was much lower. Immunoprecipitation experiments were also carried out using antibodies against cyclin A, cdc2 or cyclin B on samples obtained at 5 h after HU release. The phosphorylation of the two proteins was also observed when the immunoprecipitation was carried out with anti-cyclin A antibodies whereas it was not detected when anti-cdc2 or anti-cyclin B were used, indicating that the phosphorylation of these proteins is specific of cyclin A/cdk2 complexes.

Since HeLa cells are cells from a human carcinoma we were interested to analyze whether

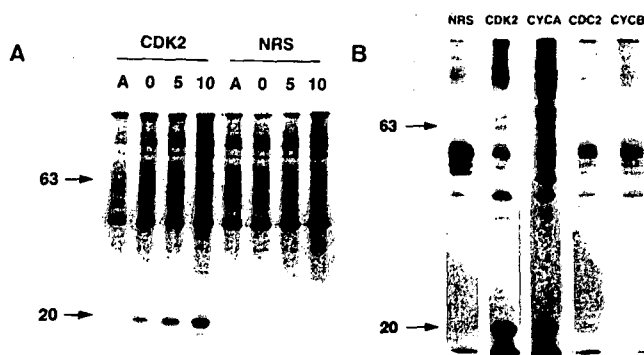


FIG. 1. Associated nuclear protein substrates of cdk2 in HeLa cells. (A) HeLa cells were synchronized as described under Material and Methods and S1 nuclear extracts were obtained at 0, 5 and 10 h after HU block release. The fractions were immunoprecipitated with antibodies against cdk2 or with a normal rabbit serum (NRS) used as a control and then phosphorylated with ³²P-ATP. The arrows indicate the Mr of proteins of 20 and 63 kDa which were phosphorylated in the immunoprecipitates. (B) Nuclear extracts from 5 h-synchronized cells were immunoprecipitated with antibodies against cdk2, cyclin A, cdc2, cyclin B or with a normal rabbit serum (NRS) which was used as a control and then phosphorylated with ³²P-ATP. The arrows indicate the Mr of the 20 and 63 kDa proteins phosphorylated by cdk2 and cyclin A containing complexes.

normal non-tumor cells also showed putative nuclear substrates for cdk2 and whether they are similar to those from transformed cells. Thus, rat liver cells proliferatively activated *in vivo* by a partial hepatectomy were used for this purpose. S1 nuclear fractions from normal non-operated rats and at 12 h (late G1) and 24 h (S phase) after a PH were obtained and subjected to immunoprecipitation using anti-cdk2 antibodies. No specific phosphorylation of proteins was observed neither in quiescent nor in 12 h-activated hepatocytes (data not shown). However, in the samples from 24 h-hepatectomized rats the specific phosphorylation of proteins of 21, 37, 39, 57 and 112 kDa was observed. In order to see whether putative cdk2 substrates can be detected in other nuclear subfractions, experiments were also carried out in samples obtained after subsequent extraccion of purified nuclei with 1.6 M NaCl (S2 fraction) at the same times after PH. Results also revealed the specific phosphorylation of proteins of 20, 21, 25, 29, 34, 37, 39 and 57 kDa in the S2 fraction from 24 h-hepatectomized rats (Fig. 2).

Since the pattern of phosphorylated proteins in the immunoprecipitates from S1 samples was clearly different in HeLa and normal rat liver cells, we performed experiments in order to compare the cdk2 substrates in these fractions obtained from normal and transformed cells from a similar origin. We selected to study the putative nuclear cdk2 substrates in normal human T lymphocytes and in a lymphoblastoid cell line (Namalwa). As shown in Fig. 3 proteins of 21, 25, 37, 40, 57 and 70 kDa were specifically phosphorylated in the immunoprecipitates from S phase normal lymphocytes whereas only a slight phosphorylation of several proteins was observed in the quiescent samples. Interestingly, the phosphorylation pattern of proteins in the transformed cell line Namalwa was different from that of the activated normal lymphocytes. Thus, in S1 fraction from Namalwa cells, proteins of 20, 21, 40, 65, 67, 70 and 112 kDa were specifically phosphorylated (fig. 3). As it can be observed also in fig. 3, three phosphorylated proteins (21, 40 and 70 kDa) are shared by S-phase normal T lymphocytes and Namalwa cells. The intensity of the phosphorylation of the 21 kDa protein is different in both samples: it is highly phosphorylated in normal lymphocytes whereas the phosphorylation is scarce in Namalwa cells. Moreover, three bands of 25, 37 and 57 kDa are also specifically phosphorylated in 72 h-activated T-lymphocytes.

DISCUSSION

Cdk2 as well as cdc2 have been reported to be present in the nucleus of proliferating cells (5). Although several nuclear proteins as histone H1, lamins, certain transcription factors, certain high mobility group proteins and several other proteins have been proposed to be substrates of cdc2 not much information is available concerning to the putative nuclear substrates of cdk2 (4). We report here the presence of a number of nuclear proteins which are phosphorylated in the immunopre-

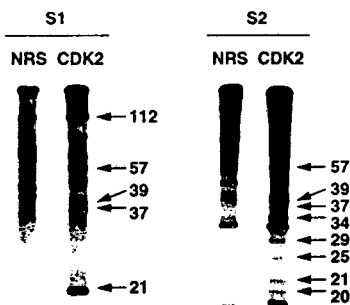


FIG. 2. Associated nuclear protein substrates of cdk2 in proliferating hepatocytes. S1 and S2 nuclear fractions from 24 h-hepatectomized rats were obtained as described under Materials and Methods. The samples were immunoprecipitated using anti-cdk2 antibodies or with a normal rabbit serum (NRS) used as a control and then phosphorylated with ^{32}P -ATP. The arrows indicate the Mr (kDa) of the proteins phosphorylated by cdk2 containing complexes in both fractions.

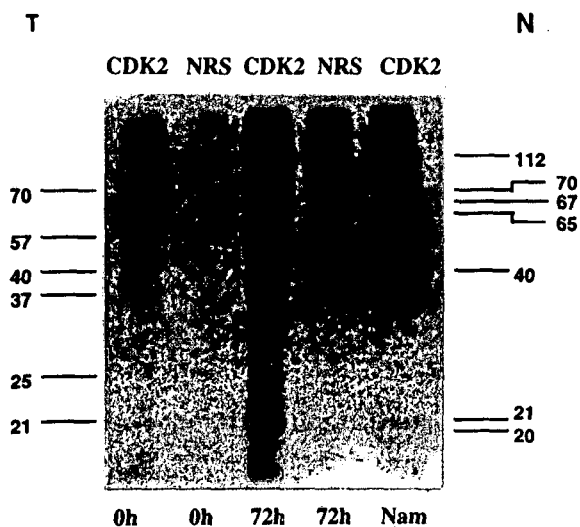


FIG. 3. Associated nuclear protein substrates of cdk2 in normal T-lymphocytes and Namalwa cells. S1 nuclear fraction from quiescent (0 h), activated T-lymphocytes (72 h) and from Namalwa cells (Nam) were immunoprecipitated with antibodies against cdk2 or with a normal rabbit serum (NRS) used as a control and phosphorylated with ^{32}P -ATP. The lines indicate the Mr (kDa) of proteins phosphorylated by cdk2 containing complexes in the T-lymphocytes (T) or in the Namalwa cells (N).

cipitates obtained by using anti-cdk2 antibodies in different cellular types. Most of the experiments were performed in a nuclear subfraction (S1) obtained by extracting nuclei purified from several different cellular types with nucleases (DNase + RNase) since a previous report revealed the presence of cdk2 in this nuclear fraction (5). S1 nuclear fraction is enriched with proteins associated to the hnRNA located at the transcription sites or with the hn ribonucleoprotein particles (11). Also proteins associated to the replication factories and therefore involved in DNA synthesis as DNA polymerase α and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) have been found in this nuclear fraction (5). Thus, these putative cdk2 substrates could be proteins involved in DNA replication, transcription or hnRNA processing. Results reported here indicate that the two normal cellular types studied here (human T lymphocytes and rat hepatocytes) share three proteins putative cdk2 substrates of 21, 37 and 57 kDa. In addition, each cell type also contain several other proteins which are phosphorylated in the immunoprecipitates. The two transformed cell lines (Namalwa and HeLa) only share a 20 kDa substrate. Likewise, both transformed cell lines also contain specific putative cdk2 substrates. On comparing the phosphorylated proteins from all the normal and transformed cell lines analyzed here it can be observed that no common proteins to all cells lines were detected. When normal and transformed lymphocytes were compared, it can be seen that transformation produce changes in the proteins associated to cdk2 which are phosphorylated by this kinase. These results reveal that several proteins present in the cdk2 complexes from normal lymphocytes are separated from these complexes after transformation or alternatively these proteins could be already phosphorylated in transformed cells, thus the phosphorylation with radioactive ATP in the assays could not take place since the phosphorylation sites are already occupied. In fact the first possibility has been proved at least for several proteins associated to cdk2. It has been reported that the quaternary complexes of cdk2/PCNA/p21 and cyclin A are disrupted in most cancer cells (12).

Interestingly, when another subnuclear fraction (S2) from proliferating rat liver cells was subjected to the same type of analysis also a number of protein substrates of cdk2 were detected. Most of the proteins found in this nuclear fraction are different of those detected in the S1 fraction, indicating that cdk2 has a number of specific substrates in different compartments of the cell nucleus.

Although the nuclear proteins which are specifically phosphorylated by cdk2 in the different cellular types we have studied here, still remain to be identified, the experimental approach used here opens a way for the identification of a group of nuclear proteins associated to this protein kinase. Interestingly, new putative cdk2 substrates can be detected by this method and the identification of these proteins is currently underway in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF93-109) and from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (94/792). Montserrat Jaumot is a FPI fellowship recipient from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

REFERENCES

1. Lees, E. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 773-780.
2. Pines, J. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 144-148.
3. Sherr, C. J. (1993) *Cell* **73**, 1059-1065.
4. Nigg, E. A. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 187-193.
5. Jaumot, M., Graña, X., Giordano, A., Reddy, P. V., Agell, N., and Bachs, O. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1527-1534.
6. Ashihara, T., and Baserga, R. (1979) *Methods Enzymol.* **58**, 248-262.
7. Colomer, J., Agell, N., Engel, P., Alberola-Ila, J., and Bachs, O. (1993) *Cell Calcium* **14**, 609-618.
8. Higgings, G. M., and Anderson, R. M. (1931) *Arch. Pathol.* **12**, 186-202.
9. Graña, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P. P., Rosenblatt, J., Morgan, D. O., and Giordano, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3834-3838.
10. Kaufmann, S. H., and Shaper, J. H. (1984) *Exp. Cell Res.* **155**, 477-495.
11. Bosser, R., Faura, M., Serratos, J., Renau-Piqueras, J., Pruschy, M., and Bachs, O. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 661-670.
12. Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K., and Beach, D. (1995) *Cell* **82**, 915-925.

Fig 1.

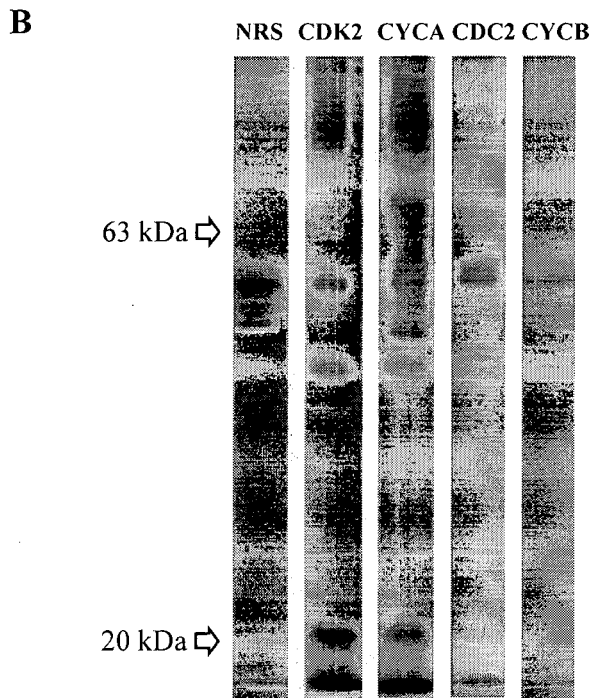
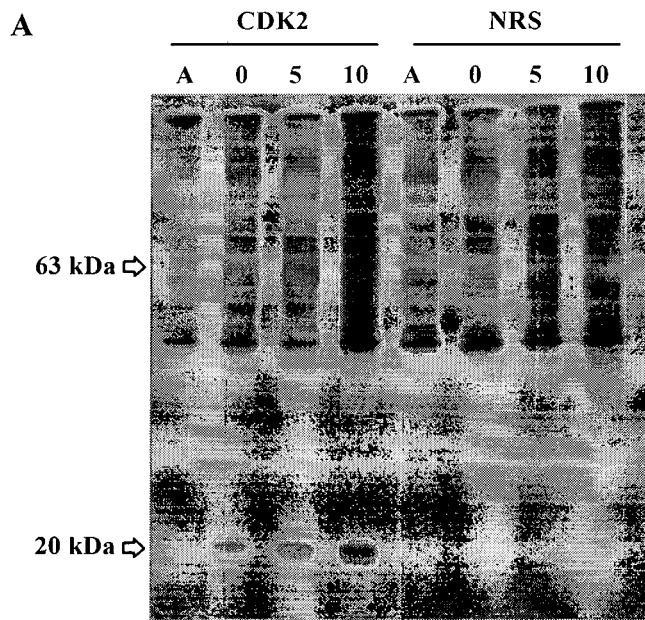


Fig 2.

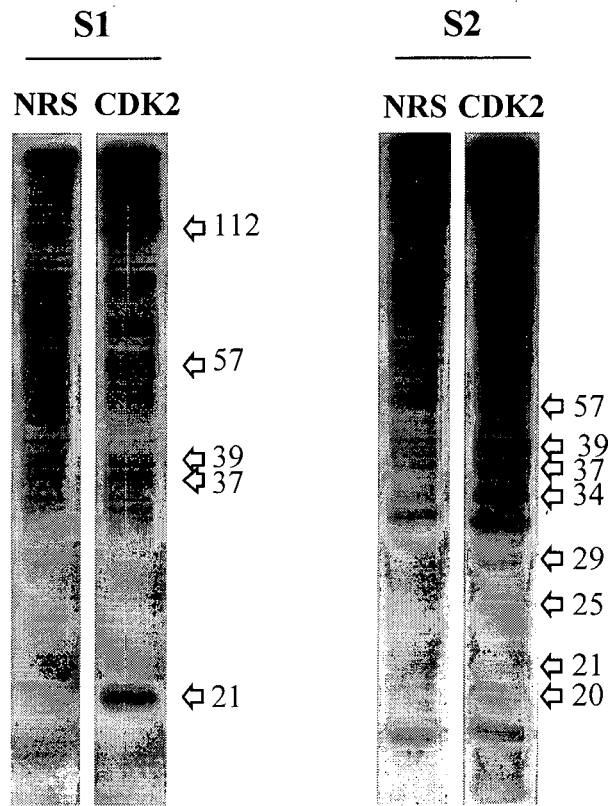
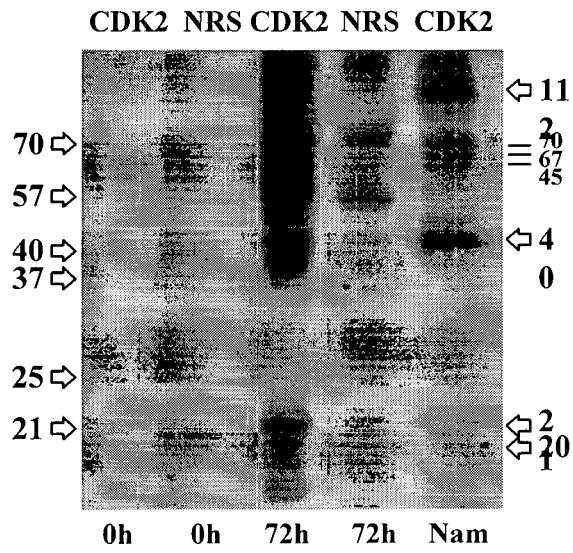


Fig 3.



SINCRONITZACIÓ DE LES CÈL.LULES HELA PER RESTRICCIÓ DE SÈRUM I AMB HIDROXIUREA.

Annex 1

Objectiu:

L'objectiu d'aquest annex és descriure la tècnica seguida a l'article 2 per sincronitzar les cèl.lules HeLa.

Introducció:

Tant si es realitzen els estudis experimentals en l'àmbit del propi organisme, com si es fan servir cultius cel.lulars, cal tenir en comte que trobarem cèl.lules en totes les fases del cicle cel.lular i amb un tant per cent en cada una proporcional a la durada de la fase; és a dir, existeix una asincronia. Hi ha diferents aproximacions experimentals per tal d'aconseguir un cultiu cel.lular sincrònic.

La restricció de sèrum en el medi de cultiu és una estratègia molt usual per tal d'aturar les cèl.lules en la fase G1 i retornar-les a la fase de quiescència. Aquest és un bon sistema només per a determinades línies cel.lulars. N'hi ha d'altres, com les cèl.lules HeLa i diverses línies transformades, les quals mai assoleixen la quiescència i que responen feblement a aquesta limitació en el seu medi nutricional. Per tal d'aturar el cicle cel.lular d'aquestes cèl.lules cal utilitzar un mètode combinat de restricció de sèrum i de tractament amb algun tipus de droga.

La hidroxiurea és una droga que inhibeix específicament la síntesi del DNA, i més concretament l'enzim ribonucleòtid reductasa. Per tant amb l'exposició de les cèl.lules a aquesta droga s'obté un cultiu aturat al llindar de les fases G1 i S. L'alliberament de la droga es tradueix en una ràpida i sincrònica entrada del cultiu a la fase S.

Material i Mètodes:

Les cèl.lules es replanten a una densitat de $2,5 \times 10^5$ cèl.lules per placa de cultiu de 10 mm en el seu medi usual que és DMEM suplementat amb 10 % de sèrum fetal (FCS) i es fan créixer durant durant 3 dies. Una vegada transcorregut aquest temps, el medi de cultiu és substituït pel mateix, però ara restringit a un 0.5 % de sèrum fetal (realitzant prèviament 2 rentats amb PBS). Es manté el cultiu en aquestes condicions durant 2 dies, i es torna a substituir el medi deficient per medi suplementat amb el 10% de FCS durant 6 hores. Seguidament, s'afegeix a les plaques hidroxiurea concentrada (100 mM *stock*) fins arribar a una concentració final de 1.5 mM durant 14 hores. Transcorregut aquest temps, tenim les cèl.lules aturades en el llinar G1/S; es treu la hidroxiurea, es fan 2 rentats amb PBS i s'afegeix medi suplementat amb 10% de FCS amb la qual cosa les cèl.lules entren sincrònicament a la fase S.

En el nostre estudi s'han agafat mostres de cultiu asincrònic, a les 0 hores (14 hores amb hidroxiurea), a les 5 hores i a les 10 hores després d'haver alliberat el cultiu de la droga. Les mostres es fixen amb etanol, i seguidament es tenyeix el DNA amb *propidium iodide* i es fa un tractament amb RNasa durant 30' a 37°C. El colorant s'intercala en la doble cadena de DNA i emet fluorescència vermella proporcional al contingut de DNA de les cèl.lules quan s'excita amb llum blava. La tècnica utilitzada per valorar el tant per cent de sincronia dels cultius estudiats ha estat la citometria de flux, que en aquest cas s'aplica per mesurar el contingut de DNA de les cèl.lules. Les cèl.lules a la fase G2 i M tenen el doble de DNA que les cèl.lules en G0 i G1; i les que es troben a la fase S tenen un contingut de DNA entremig dels dos anteriors. L'aparell dóna els resultats representats en histogrames.

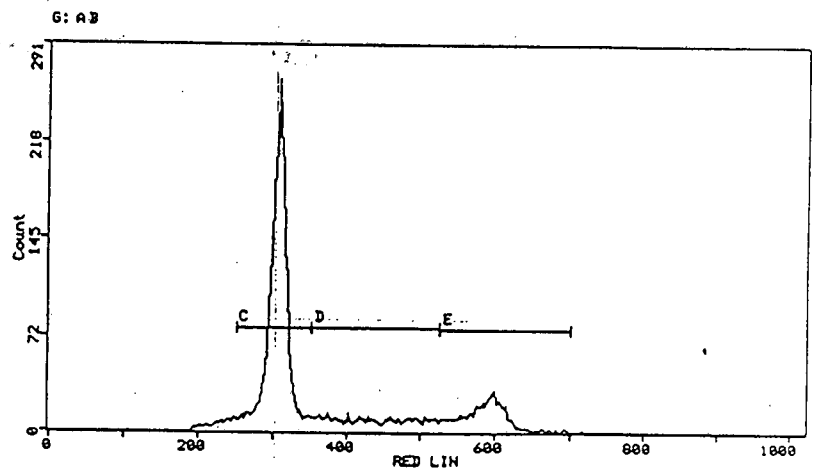
Aquest mètode és una adaptació del descrit per Chang i Baserga (1977).

Resultats:

En aquest apartat s'exposen els histogrames del contingut de DNA, i el tant per cent de cèl.lules en cada una de les fases del cicle, mesurats en cada mostra d'un experiment de sincronització concret.

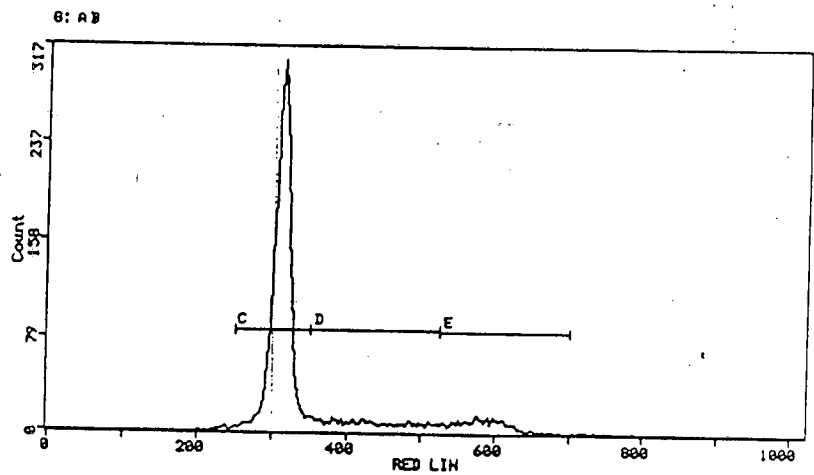
Mostra: assincrònica.

% fase G1: 63,9
 % fase S: 15,8
 % fase G2/M: 16,9



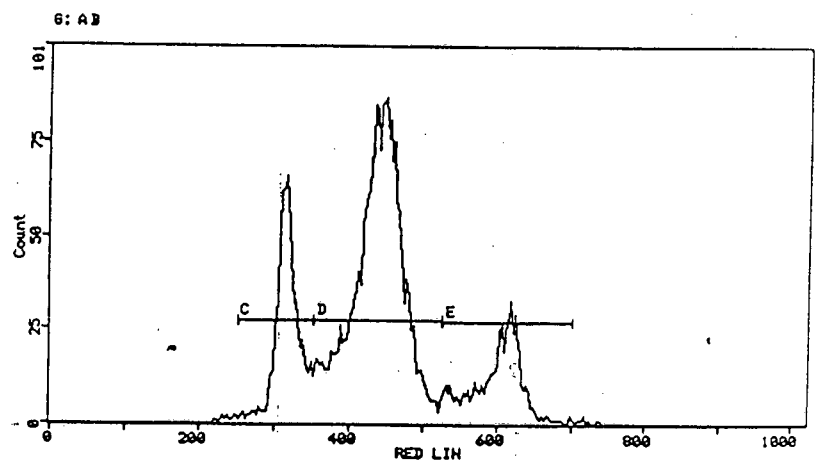
Mostra 0 hores.

% fase G1: 76,0
 % fase S: 13,1
 % fase G2/M: 9,7



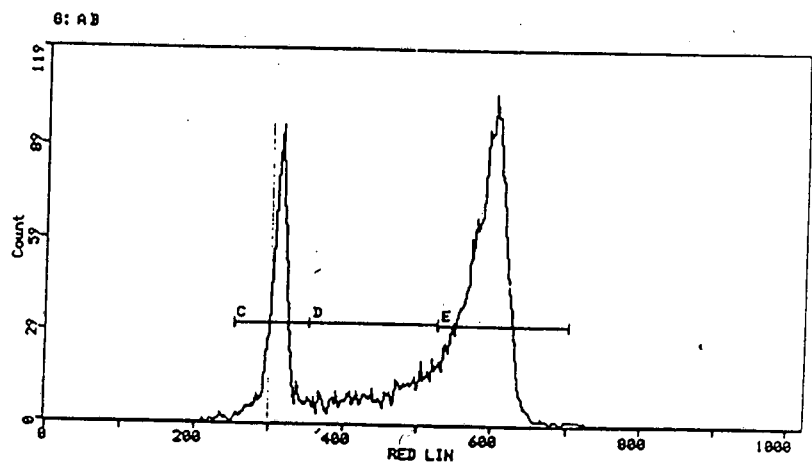
Mostra 5 hores.

% fase G1: 19,8
 % fase S: 63,1
 % fase G2/M: 16,4



Mostra 10 hores.

% fase G1: 22,9
 % fase S: 16,8
 % fase G2/M: 59,7



Els resultats indiquen que a la mostra asincrònica conté un tant per cent molt elevat de cèl.lules en la fase G1; la mostra de 0 hores correspon a un cultiu aturat al llindar G1/S; la mostra de 5 hores manté la sincronia (una mica més baixa) i les cèl.lules estan majoritàriament a la fase S; i per últim a les 10 hores de l'alliberament de la hidroxiurea les cèl.lules es troben a G2/M. Cal destacar que a les 5 i 10 hores arrosseguem una població d'un 20 % de cèl.lules en G1 que no han avançat en el cicle per alguna raó.

CARACTERITZACIÓ DE LA CDK2 EN CÈL.LULES HELA SINCRONITZADES .

Annex 2

Objectiu:

L'objectiu d'aquest annex és analitzar l'expressió de cdk2, l'activitat quinasa associada, i els complexos que forma aquesta proteïna en les mostres de cèl.lules HeLa sincronitzades.

Introducció:

Les cèl.lules HeLa sincronitzades amb hidroxiaurea i restricció de sèrum en el medi de cultiu presenten el pic de màxima síntesi de DNA cinc hores més tard de l'alliberament de la droga. La cdk2 associada a la ciclina E està implicada en la transició de la fase G1 a la S, i la cdk2 associada a la ciclina A és essencial per la progressió de la fase S.

Material i Mètodes:

Preparació dels extractes cel.lulars: Les cèl.lules es lisen en tampó IP (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,1% Tritó X-100, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1mM PMSF i 10 µg/ml de leupeptina).

Electroforesi i immunoblot: les proteïnes es separen electroforèticament per SDS-PAGE segons Laemmli (1970). Els gels es transfereixen a membranes de Immobilon-P (Millipore) en 10 mM CAPS (pH 11) amb 10% de metanol. Les membranes es preincuben en tampó TBS (20 mM Tris-HCl i 150 mM NaCl) amb 5% de llet en pols a temperatura ambient durant 1 hora. Posteriorment realitza la incubació amb l'anticòs anti-cdk2 diluït 1:500 en TBS-0,05% Tween amb 3% de llet pols a temperatura ambient durant 1 hora. Tot seguit, es fan tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb TBS-0,05% Tween 20, les membranes s'incuben amb el

segon anticòs conjugat amb peroxidasa de rave d'Amersham durant 45 minuts a temperatura ambient. Després de tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb TBS-0,05% Tween 20 i un amb TBS, es detecta l'antigen amb el sistema de quimioluminiscència de Dupont.

Immunoprecipitació: Les mostres es lisen amb el tampó IP (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,1% Tritó X-100, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1mM PMSF i 10 µg/ml de leupeptina) durant 30 minuts a 4°C. La fracció soluble s'obté per centrifugació a 10000 x g durant 10 minuts. Els sobrenadants s'incuben amb 25 µl de sèrum normal de conill per 1500 µg de proteïna total durant 30 minuts a 4°C i seguidament, amb 1 ml de SAC (*Staphylococcus aureus* Colan) per cada 25 µl de sèrum normal de conill. la barreja es centrifuga a 10000 x g durant 10 minuts i es separa acuradament el sobrenadant. Aquest es sotmet a la immunoprecipitació pròpiament dita incubant-lo amb els anticossos anti cdk2 durant 1 hora a 4°C i seguidament amb proteïna A-Sepharosa a les mateixes condicions.

Assaig quinasa associada a la histona H1: Els immunoprecipitats s'incuben a 30°C durant 20 minuts amb el tampó quinasa 2 (20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgAc, 1 mM DTT), 1 µg de histona H1 (Boehringer mannheim, Alemanya), 20 µM ATP i 10 µCi de γ -³²P ATP (Amersham, 3000 Ci/mmol) en un volum total de 25 µl. Després d'afegir 35 µl de 2x tampó de mostres de Laemmli, les mostres es bullen i es resolen electroforèticament en gels de poliacrilamida del 10%. Els gels s'assequen i s'exposen amb un film per visualitzar les bandes per autorradiografia.

Marcatge metabòlic de cèl.lules HeLa sincronitzades amb metionina-S³⁵: es replanten les cèl.lules en plaques de 60 mm a una densitat de 1,6x10⁵ cèl.lules per placa, i es sincronitzen amb restricció de sèrum i hidroxidrea segons el protocol descrit a l'annex 1 d'aquest capítol. Dues hores abans del temps de recollida de cada mostra, el medi de cultiu és substituït per medi sense metionina al qual se li afegeix 0,35 mCi de ³⁵S-metionina (Amersham AG 1094, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, Redivue) per placa.

Resultats :

Expressió de cdk2: Es va realitzar l'anàlisi per immunoblot amb anticossos anti cdk2 dels extractes totals de mostres de cèl.lules HeLa sincronitzades de 0 (G1/S), 5 (S) i 10 (G2/M) hores. Com podem observar a la figura 1 no es van detectar diferències en els nivells de cdk2 entre les mostres.

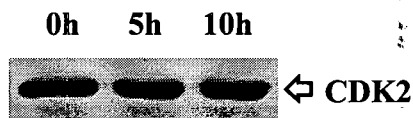


Fig 1. Expressió de cdk2 en extractes totals de cèl.lules HeLa sincronitzades.

Mesura de l'activitat quinasa de cdk2 associada a la histona H1: Els extractes totals de cèl.lules HeLa sincròniques de 0, 5 i 10 hores es van immunoprecipitar amb anticossos anti cdk2 i seguidament, es va analitzar l'activitat quinasa utilitzant com a substrat exogen la histona H1. Els resultats assenyalen que l'activitat quinasa incrementa a mesura que les cèl.lules avancen en el cicle des de G1/S fins a la mitosi.

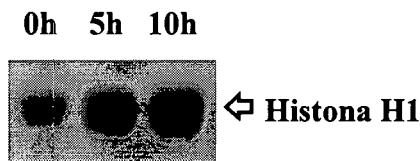


Fig 2. Activitat quinasa cdk2 associada a la histona H1 en extractes totals de cèl.lules HeLa sincronitzades.

Anàlisi dels complexos cdk2 i ciclina A en cèl.lules HeLa sincronitzades i marcades metabòlicament amb metionina- S^{35} . Es van sincronitzar i marcar metabòlicament dues plaques (60 mm) per punt (assincròniques, 0, 5 i 10 hores), segons el procediment descrit a l'apartat dels Materials i Mètodes d'aquest annex. Els *pellets* de cèl.lules es van lisar i els sobrenadants es van aclarir amb SAC segons el protocol. Seguidament, es va contar la radioactivitat total incorporada a la proteïna per cada un dels punts i es van fer els càlculs corresponents amb l'objectiu de procedir a

les immunoprecipitacions amb la mateixa quantitat de proteïna marcada radioactivament per punt. Es van realitzar les immunoprecipitacions amb anticossos anti cdk2, ciclina A i amb sèrum normal de conill com a control.

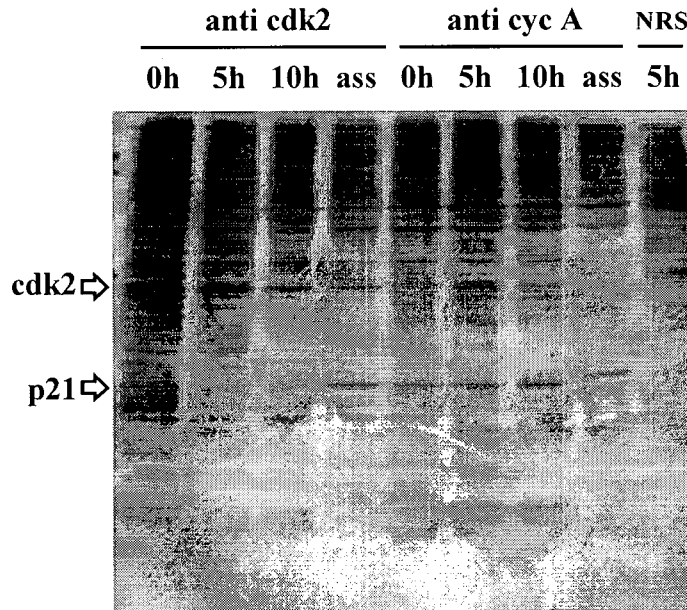


Fig 3. Immunocomplexes de cdk2, ciclina A i NRS de mostres de cèl.lules HeLa marcades metabòlicament amb metionina- S^{35} i sincronitzades.

Tal com s'observa a la figura 3, no es detecten variacions en la quantitat de p21 que s'associa a la ciclina A en les diferents hores de sincronització. Contràriament, si que va incrementant la p21 associada a cdk2 a mesura que s'avança en el cicle cel.lular des del llindar G1/S (punt 0 hores), S (punt 5 hores), i G2/M (punt 10 hores), amb un màxim a les mostres de cèl.lules HeLa asincròniques.

1917

1917

CAPÍTOL III.

Els complexes ciclina A-cdk2 fosforilen l'inhibidor de cycle cel.lular p21CIP.

Resum

El nombre de substrats fisiològics coneguts dels complexos cdks-ciclins és molt limitat. La identificació d'aquests substrats és essencial per entendre el mecanisme d'actuació de les quinases responsables del control del cycle cel.lular.

En estudis previs duts a terme amb l'objectiu de caracteritzar nous substrats de cdk2, es va evidenciar la presència d'una proteïna de pes molecular de 18-21 kDa, que es fosforilava específicament en immunocomplexes obtinguts contra aquesta quinasa en extractes nuclears de cèl.lules HeLa. L'objectiu del present treball ha estat identificar aquesta proteïna. Per proximitat entre pesos molecular, es va escollir la proteïna inhibidora de cdks p21CIP com a possible candidata de la recerca.

L'aproximació experimental realitzada va estar en primer lloc, confirmar per immunoblot la presència de l'inhibidor p21CIP en lisats totals i en immunoprecipitats de p21, cdk2 i ciclina A obtinguts de cèl.lules HeLa. Seguidament, es va demostrar que la proteïna p21CIP es podia fosforilar per cdk2 amb assajos de fosforilació d'immunoprecipitats de cdk2 seguits d'immunoblots amb anticossos contra aquest inhibidor. Experiments de doble immunoprecipitació van confirmar d'una altra manera aquests resultats; la proteïna de 21 kDa fosforilada en els complexos de cdk2 era reimmunoprecipitada amb anticossos contra l'inhibidor p21CIP. Per últim, es va demostrar *in vitro* que la quinasa cdk2 podia fosforilar l'inhibidor p21CIP a partir d'experiments de fosforilació utilitzant en aquest cas les proteïnes recombinants. Curiosament, la p21 recombinant, es fosforila només quan els nivells de p21 són elevats, i per tant, quan l'activitat quinasa de cdk2 sobre altres substrats com la histona H1 és baixa.

El significat fisiològic de la fosforilació de la proteïna p21CIP no es coneix. Sembla ser que aquesta proteïna té altres funcions diferents a la d'inhibidor de les cdks dins el cycle cel.lular com evidencien alguns treballs recents. P21 s'ha proposat

com a proteïna medidora de la translocació al nucli de ciclina D-cdk4 i possiblement d'altres complexos cdk; també s'hipotetitzava el seu paper com a factor d'acoblament dels complexos cdk-ciclins. La fosforilació de p21CIP podria estar relacionada amb alguna d'aquestes funcions, o possiblement amb la seva degradació via ubiquitina com succeeix amb l'inhibidor p27.

THE CELL CYCLE INHIBITOR P21^{CIP} IS PHOSPHORYLATED BY CYCLIN A-CDK2 COMPLEXES

Montserrat Jaumot¹, Josep Maria Estanyol¹, Oriol Casanovas¹, Xavier Graña²,
Neus Agell¹ and Oriol Bachs¹.

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain.

² Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology. Department of Biochemistry, Temple University, School of Medicine, 3307 Broad St., Philadelphia, PA 19140, USA.

We report here experimental evidence indicating that p21^{CIP}, the universal inhibitor of cyclin-dependent protein kinases, is a substrate of cyclin A-cdk2. The evidence comes from phosphorylation experiments in which the endogenous p21^{CIP} present in cyclin A-cdk2 complexes immunoprecipitated from HeLa cells extracts can be phosphorylated by the cdk2 of the same complexes. *In vitro* experiments showing that reconstituted GSTcyclin A-GSTcdk2 complexes phosphorylate recombinant GSTp21^{CIP} confirms that p21^{CIP} is a cyclin A-cdk2 substrate.

Cell cycle progression in mammalian cells is a highly regulated process. The sequential activation of a family of serine-threonine protein kinases named cyclin-dependent kinases (cdks) plays a critical role in this regulation. To be active, cdks need to be associated to regulatory subunits named cyclins (1). Specific cyclin-cdks complexes are activated at different intervals during the cell cycle (2). Thus, D type cyclins-cdk4/6 complexes are activated at mid G1, cyclin E-cdk2 complexes are necessary for G1/S transition, cyclin A-cdk2 for S phase progression and cyclin B-cdk1 for mitosis entry. In addition to cyclin binding, the activity of cdks is regulated by a variety of mechanisms: a) the phosphorylation of a conserved threonine residue by the cdk-activating kinase (CAK) which is required for kinase activation (3), b) the dephosphorylation of specific threonine and tyrosine residues by the phosphatase cdc25 which is also important for the activation of cdks (4), and c) the binding of a

number of proteins called cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) which inhibit the activity of the cdk's (5). CKIs can be classified in two families. The CIP/KIP family includes p21^{CIP}, p27^{KIP1} and p57^{KIP2}. These proteins associate with all cyclin-cdk complexes and inhibit most cdk's. The INK4 group contains p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} and p19^{INK4d} which associate with and inhibit specifically cdk4 and cdk6.

Only a few number of substrates of the cdk's during G1 and S phases have been identified (6,7). The most well known substrate of the cdk's operating during G1 and S phases is the retinoblastoma gene product (pRB). pRB is phosphorylated and consequently inactivated by cdk4 and cdk2 from mid-to-late G1 until the end of M phase. Hyperphosphorylated pRB does not associate with transcription factors of the E2F family. Free E2F factors are believed to transactivate genes required for S phase progression (8). p130 and p107, the other two members of the retinoblastoma family of proteins are also likely targets (9). Other putative G1/S cdk substrates are the transcription factor E2F-1 and DP-1. It has been reported that inhibition of the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 complexes is caused by the phosphorylation of DP-1 by cyclin A-cdk2 complexes (10, 11). It has also been shown that the replication protein A (RP-A) is also phosphorylated by cdk's (12). Finally, the R2 component of the ribonucleotide reductase, an enzyme involved in the supply of deoxyribonucleotides required for DNA synthesis and repair, might be also cdk1 and cdk2 substrate (13).

Recently, it has been shown that phosphorylation by cyclin-cdk complexes results in down-regulating p27^{KIP1} and cyclins D and E (14, 15, 16, 17). In the case of p27^{KIP1}, cyclin E-cdk2 phosphorylates p27^{KIP1} and this phosphorylation causes its degradation (14). We previously reported the presence of putative substrates of cdk2 in nuclear subfractions from four different cellular types (18). We report here that a 21 kDa nuclear protein which was phosphorylated by cyclin A-cdk2 complexes from HeLa cells is the cdk-inhibitor p21^{CIP}.

Materials and Methods

Antibodies.

Polyclonal antibodies against cdk2 were obtained from Upstate Biotechnology Incorporated. Polyclonal antibodies against p21^{CIP} and cyclin A were obtained from Santa Cruz Biotechnology.

Preparation of cell lysates.

Cells were lysed in IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl) containing 50 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 10 µg/ml leupeptin. Lysates were clarified by centrifugation at 10000 x g for 10 min at 4°C.

Preparation of nuclear extracts.

HeLa cells were suspended in buffer C (150 mM sucrose, 80 mM KCl, 35 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 25 µM CaCl₂, 8 mM dithiothreitol) containing 2 mM PMSF, at a density of 5 X 10⁷ cells/ml. The cells were homogenized with a Potter-Elvehjem with Teflon pestle and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The pellet containing the nuclei, was suspended in buffer C and sonicated with 2 pulses of 20 sec each at setting 2 using a Branson sonifier. A soluble nuclear fraction was obtained by centrifugation of the sonicated pellet at 3000 rpm for 10 min at 4 °C.

Immunoprecipitation, immunoblotting and kinase assays.

Cell lysates or nuclear extracts were immunoprecipitated as previously described by Harlow and Lane (19). The immunocomplexes were resolved electrophoretically in 15 % sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrilamide gels (PAGE). The gels were transferred to Immobilon-P membranes (Millipore) in 10 mM CAPS (pH 11) containing 10 % methanol. Antigens were detected with using specific primary antibodies, horseradish peroxidase-conjugated second antibodies (Amersham) and Enhanced Chemiluminiscence reagent (Dupont). Kinase assays were performed as described by Graña et al. (20) in absence of exogenous substrate.

Protein determination.

The protein content was measured by the procedure of Bradford (21), using bovine serum albumin as standart.

DNA and Plasmids.

P21^{CIP} cDNA was obtained by PCR, sequenced and inserted in pGEX-KG vector (22) in NdeI-HindIII sites. pBluescript-SK+-CDK2 was a gift from Ed Harlow (Charlestown). The cdk2 insert was subcloned in a pGEX-KG vector in NcoI-XhoI sites. Cyclin A cDNA was inserted in a pGEX-2T vector in BamHI-EcoRI sites.

Purification of GSTp21^{CIP}, GSTcdk2 and GSTcyclin A.

Recombinant proteins were expressed in BL21 pLysE strain *Escherichia coli* transformed with either pGEX-KG-p21^{CIP}, pGEX-2T-cyclinA or pGEX-KG-cdk2. Induction, solubilization and purification of the recombinant proteins was made as described by Neet & Hunter (23) with minor modifications.

Kinase assays with the purified GSTcyclin A and GSTcdk2.

Kinase assays were performed in 25 µl total volume, containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 30µM ATP, 5 µCi of (γ-³²P) ATP (Amersham 3000 Ci/mmol), 400 nM GSTcdk2, and 400 nM GSTcyclin A and different concentrations of GSTp21^{CIP} (from 0 nM to 1200 nM). The experiments were performed in the presence or in the absence of 1.3 µM histone H1 (Boehringer Mannheim, Germany). The reactions were stopped by the addition of 8.3 µl of 4x Laemmli sample buffer. The samples were boiled and resolved by 12 % SDS-PAGE. The gels were dried and the phosphorylated proteins were visualized by autoradiography.

Results

We have investigated the presence of p21^{CIP} in cyclin A-cdk2 complexes from HeLa cells. The complexes were obtained by immunoprecipitating extracts from asynchronously growing HeLa cells using anti-cdk2, anti-cyclin A, anti-p21^{CIP} antibodies or normal rabbit serum (NRS) which was used as a control. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and subsequently to western blotting using specific anti-p21^{CIP} antibodies. As showed in Fig. 1A, p21^{CIP} was detected in total lysates and in p21^{CIP}, cdk2 and cyclin A immunoprecipitates. The absence of p16^{INK4a} in cdk2 and cyclin A complexes was confirmed by immunoblotting using specific anti-p16^{INK4a} antibodies (Fig.1B).

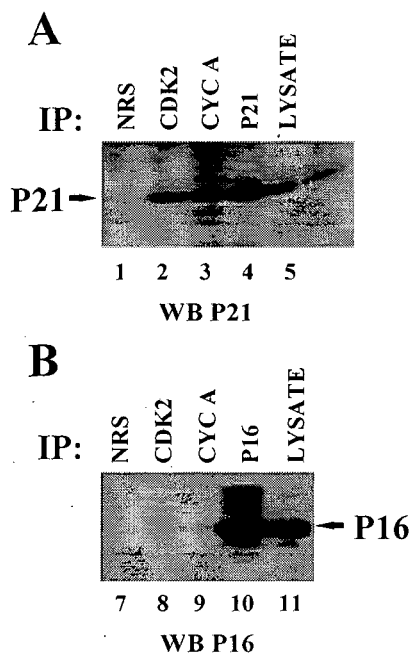


Fig. 1. p21^{CIP} is associated with cdk2 and cyclin A in HeLa cells. (A) Total lysates from HeLa cells, prepared as described under Materials and Methods, were immunoprecipitated with a normal rabbit serum (NRS) which was used as a control or with antibodies against cdk2, cyclin A and p21^{CIP} (lanes 1 to 4). The immunoprecipitates and a sample of the HeLa cells lysate (lane 5) were subjected to western blotting analysis using antibodies against p21^{CIP}. (B) Total lysates from HeLa cells, were immunoprecipitated with NRS or with antibodies against cdk2, cyclin A and p16 (lanes 7 to 10). The immunoprecipitates and a sample of the HeLa cells lysate (lane 11) were subjected to western blotting analysis using antibodies against p16.

In order to analyze whether p21^{CIP} could be phosphorylated by cdk2, HeLa cells lysates were immunoprecipitated using anti-cdk2 antibodies (Fig. 2, lanes 1', 2', and 3') or NRS (Fig. 2, lanes 1, 2, and 3). Then, the immunoprecipitates were subjected to phosphorylation assays, using cold ATP (lanes 1 and 1'), ³²P-ATP (lanes 2 and 2'), or without ATP (lanes 3 and 3'). Upon phosphorylation, the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and subsequently the proteins transferred to PVDF membrane. The membrane was firstly exposed onto an

autoradiographic film and subsequently subjected to western blotting using antibodies raised to p21^{CIP}. Fig 2 exhibits several phosphorylated bands which were only observed in the sample incubated with ³²P-ATP (lane 2'). One of the most prominent phosphorylated bands showed a Mr of 21 kDa and it comigrated with the band corresponding to p21^{CIP} observed by immunoblotting. These results suggest that the 21 kDa phosphorylated band could correspond to p21^{CIP}.

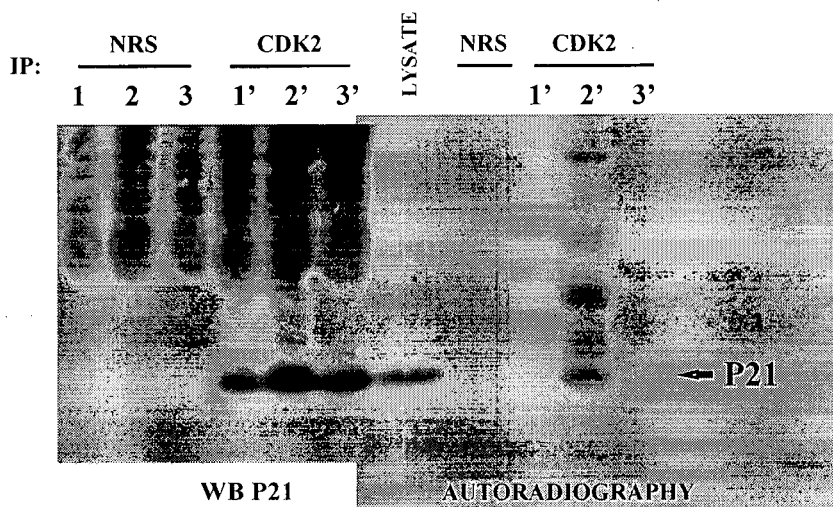


Fig. 2. Total lysates from HeLa cells were immunoprecipitated with a normal rabbit serum (NRS) which was used as a control (lanes 1, 2 and 3) or with antibodies against cdk2 (lanes 1', 2' and 3'). The immunoprecipitates were then subjected to phosphorylation assays in the presence of cold ATP (lanes 1 and 1'), ³²P-ATP (lanes 2 and 2'), or in the absence of ATP (lanes 3 and 3'). After the phosphorylation assays, the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and subsequently the proteins transferred to a PVDF membrane. The membrane was firstly exposed onto an autoradiographic film and subsequently subjected to western blotting using antibodies against p21^{CIP}. In the lane 2' a 21 kDa phosphorylated protein appeared to comigrate with the band corresponding to p21^{CIP} observed by western blotting.

To establish that the 21 kDa phosphorylated band was p21^{CIP}, a double immunoprecipitation experiment was performed. Thus, extracts from HeLa cells were immunoprecipitated with anti-cdk2 antibodies or NRS. The complexes were then subjected to phosphorylation using ³²P-ATP. The incubation was stopped adding 2 % SDS. Then, the samples were diluted with PBS and centrifugated. Finally, the supernatant which contained the phosphorylated cdk2 substrates was immunoprecipitated with antibodies against p21^{CIP}. As showed in Fig. 3 the protein of 21 kDa phosphorylated in the cdk2 complexes was re-immunoprecipitated by the anti-

p21^{CIP} antibodies, indicating that the protein phosphorylated in cdk2 immunoprecipitates was indeed p21^{CIP}.

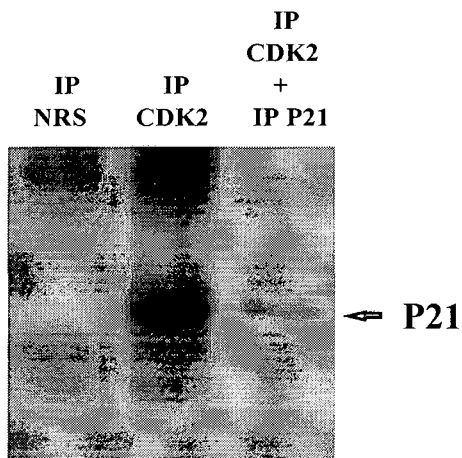


Fig. 3. Nuclear extracts from HeLa cells prepared as described under Materials and Methods, were immunoprecipitated with antibodies against cdk2 or with a normal rabbit serum (NRS) which was used as a control. The immunoprecipitates were then phosphorylated with ³²P-ATP and subjected to SDS-PAGE and subsequently to autoradiography. The immunoprecipitate obtained using anti-cdk2 antibodies was solubilized and re-immunoprecipitated using antibodies against p21^{CIP}.

Since we could not rule out the possibility that other kinases, different of cdk2, were present in the immunoprecipitates, *in vitro* phosphorylation experiments using recombinant proteins were also performed to definitively establish that cdk2 can phosphorylate p21^{CIP}. Thus, recombinant GSTp21^{CIP}, GSTcdk2 and GSTcyclin A were purified and then phosphorylation of GSTp21^{CIP} by reconstituted GSTcyclin A-GSTcdk2 complexes was analyzed. To firstly determine whether GSTp21^{CIP} was functionally active as inhibitor, the activity of GSTcyclin A-GSTcdk2 using histone H1 as a substrate was determined in presence of increasing amounts of GSTp21^{CIP}. For this experiment 400 nM of GSTcdk2 and 400 nM of GSTcyclin A were used. As shown in Fig.4, a dose-dependent inhibitory effect of p21^{CIP} on the phosphorylation of histone H1 was observed, indicating that recombinant GSTp21^{CIP} was functionally active.

To determine whether GSTp21^{CIP} could be phosphorylated *in vitro* by GSTcyclin A-GSTcdk2 complexes, the same experiment, but in absence of histone H1, was carried out. As it can be observed in Fig. 4, GSTp21^{CIP} was phosphorylated *in vitro* by these complexes at concentrations of GSTp21^{CIP} higher than 60 nM. Under this conditions, no phosphorylation of GST was observed when used as a substrate at concentrations of 1.2 μ M (data not shown). It was also observed that GSTcdk2 but not GSTcyclin A was phosphorylated in these assays.

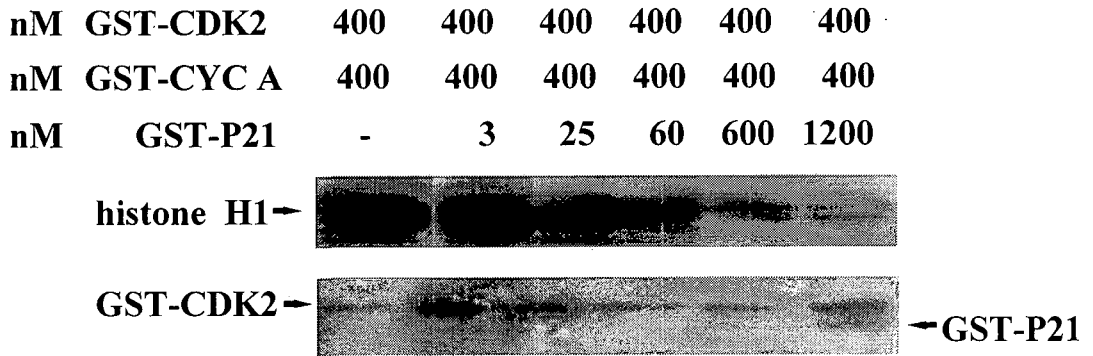


Fig. 4. GSTp21^{CIP} inhibits the activity of GSTcyclin A-GST cdk2 complexes *in vitro* and it is phosphorylated by these complexes. Increasing amounts of GSTp21^{CIP} were added to a mixture of purified GSTcdk2 and GSTcyclinA (400 nM each). Then, the kinase activity assayed using histone H1 (1 μ g) as a substrate was determined (upper line). In a similar experiment the kinase assay was performed in the absence of histone H1. In this experiment the phosphorylation of GSTp21^{CIP} and the autophosphorylation of GSTcdk2 can be observed.

Discussion

In spite of the increasing amount of information concerning to the important roles of cyclin E-cdk2 in G1/S transition and cyclin A-cdk2 in S phase progression, only a small number of specific physiological substrates for these kinases have been identified. We report here experimental evidence indicating that p21^{CIP} might be a substrate of cyclin A-cdk2. The evidence comes from phosphorylation experiments in which the endogenous p21^{CIP} present in cyclin A-cdk2 complexes purified from HeLa cells can be phosphorylated by cdk2 present in the same complexes and also from *in vitro* experiments showing that reconstituted GSTcyclin A-GSTcdk2 complexes phosphorylate recombinant GSTp21^{CIP}. Interestingly, in these *in vitro* experiments the phosphorylation of p21^{CIP} was only observed when the levels of p21^{CIP} were high (the ratio p21:cyclin A-cdk2 higher than 1) and as a consequence of the inhibitory action of p21^{CIP} the activity of cdk2 was low. Whether other cyclin-cdk complexes are able to phosphorylate p21^{CIP} is currently investigated in our laboratory. A difficulty to interpretate the effect of the phosphorylation of p21^{CIP} on its functional properties is

that the actual physiological role of p21^{CIP} during the cell cycle still remains to be definitively clarified. Thus, although it is generally accepted that p21^{CIP} is an universal inhibitor of cyclin-cdk complexes, an increasing amount of data suggest that possibly this is not the main role of p21^{CIP} during the cell cycle. Most quiescent cells do not express p21^{CIP} but when cells are activated by mitogens, p21^{CIP} is synthesized and then it binds firstly to cyclin D-cdk4 and subsequently to cyclin E/A-cdk2 complexes. The activity of these complexes does not depend on p21^{CIP}-binding since p21^{CIP} has been found associated with both active and inactive cyclin-cdk complexes (24). A recent report suggest that a possible role of p21^{CIP} during the cell cycle could be to mediate the translocation of cyclin D-cdk4 (and perhaps cyclin E/A-cdk2) complexes from cytoplasm to the nucleus from mid G1 when p21^{CIP} accumulates in the cell (25). Recent results, obtained in our laboratory revealed a good correlation between p21^{CIP} association with cyclin D-cdk4 and nuclear accumulation of these complexes in proliferating hepatocytes in livers subjected to a partial hepatectomy (Jaumot, Serratos and Bachs, unpublished results). These results strongly support the role of p21^{CIP} as a mediator of the cytoplasmic-nuclear transport of cyclin-cdk complexes. Thus, a possible role of the phosphorylation of p21^{CIP} by cyclin-cdks could be on the modulation of the cytoplasmic-nuclear transport of cyclin-cdk complexes. On the other hand p21^{CIP} phosphorylation may regulate its association with other protein and/or its own turnover. In this regard, a recent report indicate that p27^{KIP1} is phosphorylated by cyclin E-cdk2 complexes. This phosphorylation induces the degradation of this inhibitor via the ubiquitin-proteosome pathway (14).

Acknowledgments

This work was financially supported by Grants SAF96-0187-C02-01 and SAF97-0069 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and by Grants 94/1017 and 94/0792 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISs). We are very grateful to Dr. Xavier Mayol and Dr. Judit Garriga (Philadelphia) for technical advice and helpfull discussions.

References

1. Sherr, C. J. (1994) *Cell* **79**, 551-556.
2. Graña, X., and Reddy, E. P. (1995) *Oncogene* **11**, 211-219.
3. Poon, R. Y., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., and Huttelworth, I. (1993) *Embo J.* **12**, 3133-3142.
4. Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1549-56.
5. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995) *Genes & Dev.* **9**, 1149-1163.
6. Nigg, E. A. (1993) *Current Opin. Cell Biol.* **5**, 187-193.
7. Nigg, E. A. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 296-301.
8. Decaprio, J. A., Furukawa, Y., Aichenbaum, F., Griffin, J. D., and Livingston, D. M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1795-1798.
9. Mayol, X., and Graña, X. (1997) *Progress in Cell Cycle Research*. Plenum Press, New York, USA vol 3 Chapter 13, 157-169.
10. Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W. G., Livingston, D. M. (1994) *Cell* **78**, 161-172.
11. Xu, M., Sheppard K.A., Peng, C, Y., Yee, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 8420-8431.
12. Dutta, A. and Stillman, B. (1992) *EMBO J.* **11**, 2189-2199.
13. Chan, A. K., Litchfield, D. W., and Wright, J. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 12835-12840.
14. Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E.. (1997) *Genes & Dev.* **11**, 1464-1478.
15. Diehl, J. A., Zindy, F., and Sherr, C. J. (1997) *Genes & Dev.* **11**, 957-972.
16. Won, K. A., and Reed, S. I. (1996) *EMBO J.* **15**, 4182-4193.
17. Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M., and Roberts, J. M. (1996) *Genes & Dev.* **10**, 1979-1990.
18. Jaumot, M., Agell, N., and Bachs, O. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1527- 1534.

-
19. Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. CSHL Press: Plainview, New York.
 20. Graña, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P. P., Rossenblat, J., Morgan, D. O., and Giordano, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 3834-3838.
 21. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
 22. Guan, K., and Dixon, J. E. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 262-267.
 23. Neet, K., and Hunter, T. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4908-4920.
 24. Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. (1994) *Genes & Dev.* **8**, 1750-1758.
 25. LaBaer, J., Garrett, M., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997) *Genes & Dev.* **11**, 847-862.

CAPÍTOL IV.

L'activació de la cdk4 i la cdk2 durant la regeneració hepàtica a la rata està associada a la reordenació intranuclear dels complexos ciclina-cdk.

Resum

El model de la regeneració hepàtica després de practicar una hepatectomia parcial a la rata és dels pocs sistemes *in vivo* que hi ha per estudiar el cicle cel.lular. De fet, quasi tota la informació que es té sobre els mecanismes de regulació del cicle cel.lular s'han obtingut a partir d'estudis realitzats en cultius cel.lulars, models que podem considerar *in vitro*. És possible que *in vivo*, el comportament de les proteïnes que controlen el cicle difereixi respecte a les observacions extretes de l'anàlisi de les cèl.lules fora del seu hàbitat natural. Per aquest motiu, en aquest article s'han analitzat diferents aspectes de la regulació de la proliferació hepàtica posant èmfasi en la distribució intracel.lular de les proteïnes. Les mostres analitzades pertanyen a fetge control i de fetges regenerants a 5, 13, 24 i 28 hores després d'haver estat sotmesos a una hepatectomia parcial (HP) del 70%.

En primer lloc s'analitzen els nivells d'activitat de la cdk4 i la cdk2 durant les primeres 28 hores de regeneració. Els resultats assenyalen que el màxim d'activitat per les dues quinases coincideix amb el moment de màxima síntesi de DNA i amb l'expressió del PCNA (també marcador de la fase de síntesi del DNA) a les 24 hores post HP.

A continuació, es presenta el seguiment per immunoblot de l'expressió de catorze proteïnes implicades amb la regulació del cicle cel.lular. A diferència dels resultats obtinguts en cultius cel.lulars, gairebé totes les proteïnes estudiades ja es troben presents, en quantitat, en el fetge quiescent, amb excepció de la p21 i la ciclina A que s'expressen només feblement i la p107 que no es detecta fins a les 13 hores post HP.

Tot seguit s'investiguen les proteïnes que formen complexos amb la cdk4, la ciclina D i la ciclina D3 en les mateixes mostres de fetge regenerant. Sorprenentment,

en el fetge quiescent es detecten tres tipus de complexos, ciclina D3-cdk4-p27, p16-cdk4 i minoritàriament ciclina D1-cdk4-p27, alguns d'aquests complexos contenen també p21. A mesura que s'avança en el cicle cel.lular els nivells de p21 associada a la cdk4 i a les ciclins Ds va incrementant.

Degut al diferent comportament observat al comparar els complexos ciclina D1 i ciclina D3, es va considerar interessant estudiar la localització intracel.lular per immunohistoquímica d'aquestes proteïnes. Els resultats obtinguts demostren que la ciclina D1 es localitza en el nucli des de la quiescència. Contràriament la ciclina D3, la cdk4 i la p21 es localitzen en el citoplasma i a les 5 hores post HP, entren en el nucli on es situen preferentment a la zona de l'embolcall nuclear juntament amb la ciclina D1, i més endavant totes aquestes proteïnes es distribueixen donant un marcatge típicament nuclear.

Per complementar els resultats obtinguts per immunohistoquímica es procedeix seguidament a analitzar els nivells d'activitat enzimàtica de la cdk4 i la cdk2, i de l'expressió de dotze de les proteïnes relacionades amb el control del cicle en les subfraccions nuclears S1 i matriu. El pic de màxima activitat de les dues quinases coincideix a les 24 hores post HP a la subfracció S1; aquesta activitat per una altre banda coincideix amb el moment en el qual les quinases cdk4 i cdk2, les seves ciclins activadores les ciclins D i les ciclins E i A, respectivament, i la p21 es localitzen en aquesta fracció.

Finalment assajos d'overlay amb p21-I¹²⁵ evidencien l'existència d'una proteïna de 70 kDa present a la matriu nuclear que durant la quiescència i a les 5 hores post HP té la capacitat de unir p21.

Tots aquests resultats assenyalen al fet que la regulació del cicle cel.lular durant la regeneració hepàtica a la rata difereix dels models clàssics com es comenta extensament en la discussió de l'article.

ACTIVATION OF CDK4 AND CDK2 DURING RAT LIVER REGENERATION IS ASSOCIATED TO INTRANUCLEAR REARRANGEMENTS OF CYCLIN-CDK COMPLEXES

MONTSERRAT JAUMOT, JOSEP M. ESTAÑOL, JOAN SERRATOSA*, NEUS AGELL and ORIOL BACHS

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Barcelona; and *Department of Pharmacology and Toxicology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) Barcelona, Spain.

Short Title: Cdk4 and cdk2 activation after partial hepatectomy

Corresponding author:

Prof. Oriol Bachs

Departament de Biologia Cel·lular

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Casanova 143

08036-Barcelona, Spain

Phone: 343-403 52 86

Fax: 343-402 19 07

email: bachs @medicina.ub.es

This work was financially supported by Grants SAF96-0187-C02-01 and SAF97-0069 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) and by Grants 94/1017 and 94/0792 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISs).

Abbreviations used in this paper: BSA, bovine serum albumin; CAK, cdk-activating kinase; CDK, cyclin-dependent kinase; CKI, cdk-inhibitor; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine-tetra acetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid; IP, immunoprecipitation; NaF,

sodium fluoride; NM, nuclear matrix; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PH, partial hepatectomy; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS-PAGE sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; TBS, tris-buffered saline; TBST, TBS-0.05% Tween 20.

Background/Aims: Partial hepatectomy triggers the entry of rat liver cells into the cell cycle. The signals leading to cell cycle activation converge into the cyclin-dependent kinases. Cyclin D-cdk4 and cyclin E-cdk2 were activated during G1, whereas cyclin A-cdk2 during S phase. The present study has examined the intracellular location of G1/S cyclins and cdks and its relationship with cdk4 and cdk2 activation. ***Methods:*** The status of cyclin-cdk complexes and the intracellular location of these proteins were analysed by immunocytochemistry, immunoprecipitation and western blotting. ***Results:*** In quiescent cells cyclin D3 and cdk4 were cytoplasmatic, whereas cyclin D1 was nuclear. At 5 h after hepatectomy cyclin D3 and cdk4 translocated into the nucleus. Cdk4 was activated at 24 h when located, together with cyclin D1 and cyclin D3, in a nuclear fraction called S1. Similarly, cdk2 was activated at 24 h when it was present in this nuclear fraction together with cyclins E and A. At 28 h the activities of cdk4 and cdk2 decreased when cyclin D1 and cdk2 moved out of S1 fraction. ***Conclusions:*** The activation of cdk4 and cdk2 at 24 h after hepatectomy is associated to their accumulation, together with their associated cyclins, in the nuclear S1 fraction.

Introduction

In pluricellular organisms, cell cycle is regulated by growth factors, anchorage to extracellular matrix, and contact inhibition. These extracellular factors generate intracellular signals that finally converge to a family of serine-threonine kinases named cyclin-dependent kinases (cdks) which act as molecular integrators of the different signals that regulate cell cycle progression.

Liver regeneration triggered by a partial hepatectomy (PH)¹ is a very useful model for the study of the cell cycle since it is one of the few *in vivo* models which permits the analysis of the proliferation of cells located in their original habitat. Liver contains different cellular types including hepatocytes (85-95% of the hepatic mass), and non hepatocytes cells (5-15% of hepatic mass). In normal liver from adult animals, all these cells are quiescent. They can be activated to proliferate as a response to the lost of liver mass produced by injury or experimentally as for instance by a partial hepatectomy (PH). Liver cells from hepatectomized rats enter into the G1 phase immediately after a PH. The onset of DNA synthesis is produced 14 h after surgery, being maximal at 22-24 h. A peak of mitosis is produced at 28-30 h. The non parenchymal cells start DNA synthesis 24 h later than hepatocytes. Seven days after PH, all liver cells have divided once or twice and the liver has recovered its original mass (for review see Steer², and Michalopoulos and DeFrances³).

Proliferation of the hepatocytes after PH is produced essentially as a response to the action of the Transforming Growth Factor α^4 , Epidermal Growth Factor⁵ and Hepatocyte Growth Factor⁶ (for review see Fausto et al.⁷). Before to respond to these growth factors, hepatocytes must be sensitized by a process called "priming" which seems to be induced by agents as Tumor Necrosis Factor α^8 . Sensitized hepatocytes respond to the growth factors activating the cell cycle regulatory machinery and thus entering to the cell cycle. How the cell cycle regulatory machinery is activated after PH is a question that still remains to be answered.

To be active, cdks need to be associated to regulatory subunits named cyclins. Specific cyclin-cdks complexes are activated at different intervals during the cell cycle. Thus, cyclin D-cdk4 complexes are activated at mid G1, cyclin E-cdk2 complexes are necessary for G1/S transition, cyclin A-cdk2 for progression of DNA

replication and cyclin B-cdk1 for mitosis entry (for review see Sherr⁹, Pines¹⁰, and Graña and Reddy¹¹). In addition to cyclin binding, the activity of cdks is regulated by a variety of mechanisms (reviewed in Morgan¹²): a) phosphorylation of a conserved threonine residue by the cdk-activating kinase (CAK) which is required for kinase activation; interestingly, CAK is formed by cdk7, a member of the cdk family, associated to cyclin H¹³⁻¹⁶; b) dephosphorylation of specific threonine and tyrosine residues by the phosphatase cdc25 which is also important for the activation of cdks;¹⁷ and c) binding of a number of proteins called cdk inhibitors (CKIs) which can inhibit the activity of the cdks. Two families of CKIs have been described, the Ink4 family and the Cip/Kip family.¹⁸ The Ink4 members include p16^{ink4a}, p15^{ink4b}, p18^{ink4c}, and p19^{ink4d}. They bind specifically to cdk4 and to his homologue cdk6. The Cip/Kip proteins (p21^{CIP}, p27^{KIP1}, and p57^{KIP2}) bind to and inhibit the activity of a wide range of cyclin-cdk complexes including cyclin D-cdk4/6, cyclin E-cdk2, and cyclin A-cdk2.

In spite of the increasing amount of information concerning to the regulation of the activity of cdks, the mechanisms of how cdk4 and cdk2 are actually activated and inactivated *in vivo*, still remain obscure. In some cellular types as T-lymphocytes, macrophages, fibroblasts and epithelial cells, it is assumed that quiescent cells contain low levels of D-type cyclins. Upon stimulation by growth factors the expression of D-type cyclins increases and then cyclin D-cdk4 complexes can be formed.^{19, 20} The assembly of cyclin D-cdk4 complexes requires an assembly factor whose activity is also induced by the mitogenic factors.^{20, 21} The full activation of cyclin D-cdk4 complexes further need the action of CAK and cdc25A.²² CAK is constitutively active in several cellular types, also during quiescence.

During progression of G1 phase, the activation of the complexes cyclins D-cdk4 is responsible of the phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb)²³ and the other members of the pocket family (p107 and p130).²⁴ When hypophosphorylated, these proteins bind to and inhibit some members of the E2F family of transcription factors (for review see Mayol and Graña²⁵). These proteins trans-activate the expression of some genes necessary for G1/S transition as dihydrofolate reductase, Orc1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA polymerase α , etc. (reviewed in Lam and La Thangue²⁶, and Mayol and Graña²⁵). When the pocket proteins are phosphorylated, E2Fs are released and the transcription

of these S-phase genes is activated. Cyclin E-cdk2 complexes also phosphorylate the pocket proteins, although the major role of these complexes is performed in the transition G1/S, possibly by phosphorylating key proteins involved in the firing of DNA replication.²⁷

The mechanisms leading to the inactivation of cyclins D-cdk4 and cyclin E/A-cdk2 complexes are also unclear. A possibility is that inactivation can be produced by degradation of the cyclin subunits. However, the levels of the D-type cyclins only exhibit moderate oscillations during the cell cycle and thus, other possibilities have to be also considered.

Recently, it has been reported that most of the proteins of the cell cycle regulatory machinery are already present in normal rat liver cells.²⁸⁻³¹ These reports also revealed that some of these proteins increase in hepatectomized rats. However, studies on the mechanisms involved in the activation and inactivation of the cdks are lacking in this *in vivo* model. Thus, the aim of this work has been to analyse the formation, activation and inactivation of cyclin D-cdk4 and cyclin E/A-cdk2 complexes during rat liver regeneration.

Materials and Methods

Animals and Partial Hepatectomies

Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were used for all the experiments. The animals were treated according to the European Community laws for animal care. Rats were maintained on a 12 h light/12 h darkness schedule. Food and water were provided *ad libitum*, and before the experiments rats were fasted overnight. PH were carried out according to Higgings and Anderson¹ in which 66 % of liver mass was removed under light ether anaesthesia.

Antibodies

The antibodies used in this study are summarised in Table I.

Preparation of cellular and nuclear fractions

Livers were homogenised with a Potter-Elvehjem Teflon-glass homogeniser (Wheaton, Millville, NJ) in 10 vol of STM buffer (250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 5 mM MgSO₄) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.5 µg/ml aprotinin. Homogenates were filtered through four layers of cheesecloth. Nuclei were prepared from homogenates as described by Kaufman and Shaper.³² Nuclear sub-fractions were obtained according to Kaufman and Shaper.³² Briefly, nuclei were re-suspended in STM buffer containing 250 µg/ml DNase I and 250 µg/ml RNase A. After 1 h incubation at 4°C the nuclei were sedimented at 800 x g for 10 min. The supernatant was collected and named S1. The pellet was re-suspended in LS buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.2 mM MgSO₄) containing 1 mM PMSF and 0.5 µg/ml aprotinin. Buffer HS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM MgSO₄ and 2 M NaCl) containing 1 mM PMSF and 0.5 µg/ml aprotinin was added slowly to a final NaCl concentration of 1.6 M. After 15 min incubation the sample was sedimented at 5000 x g for 20 min. The pellet was extracted again with 1.6 M salt and the new pellet, corresponding to the nuclear matrix (NM), was resuspended in STM buffer and stored at -80°C.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Proteins were separated electrophoretically in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) as described by Laemmli.³³ The gels were transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore) for 2 h at 60 V. The membranes were pre-incubated in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% deffated milk powder for 1 h at room temperature. The antigens were identified by using the antibodies summarised in Table I diluted in TBS containing 0.5 % deffated milk powder and 1% bovine serum albumin (BSA). After washing with TBS-0.05% Tween 20 (TBST), the strips were incubated with an alkaline phosphatase (Promega 1:10,000 dilution) or a horseradish peroxidase (BioRad 1:2,000 dilution) coupled secondary antibody for 45 min. After washing with TBST and TBS, the reaction was visualised with NBT/BCIP or with the enhanced chemiluminescence system (Amersham).

Protein determination

The protein content was measured by the procedure of Bradford,³⁴ using BSA as standard.

Immunoprecipitations

Samples were lysed in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, and 250 mM NaCl) containing 50 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF and 10 µg/ml leupeptin. Immunoprecipitations (IPs) were carried out as described by Harlow and Lane.³⁵ Briefly, lysates were clarified by centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were incubated with the indicated antibodies for 8 h at 4°C followed by an incubation with protein A beads for 1 h at 4°C. After washing with buffer A, the immunocomplexes were subjected to immunoblotting as described above.

Determination of Cdk4 and Cdk2 activities

To determine cdk4 activity, samples were lysed in buffer G (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 % Tween 20) containing 10 % glycerol, 1 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 0.1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 0.5 µg/ml aprotinin and 10 mM β-glycerophosphate. IPs

were carried out as described above. The kinase assays were performed as described by Matsushima et al.²⁰ Briefly, after IP, the beads were washed four times with G buffer and twice with 50 mM HEPES pH 7.5, containing 1 mM DTT. Cdk4 immunoprecipitates were incubated at 30 °C for 30 min in kinase buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, and 1 mM DTT) containing, 5 µg of soluble GST-pRb fusion protein, 2.5 mM EGTA, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 20 µM ATP and 10 µCi of {γ-³²P}ATP (Amersham 3000 Ci/mmol) in a total volume of 25 µl. Reaction was stopped by adding Laemmli sample buffer and then the samples were electrophoresed in 10 % SDS-PAGE gels. The gels were dried and the phosphorylated proteins were visualised by autoradiography.

To determine cdk2 activity the samples were lysed in buffer A and then subjected to IP using anti-cdk2 antibodies. The immunoprecipitates were incubated at 30°C for 20 min in 20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM Mg acetate and 1 mM DTT containing 3 µg of histone H1 (Boehringer Mannheim, Germany), 20 µM ATP and 10 µCi of {γ-³²P} ATP (Amersham, 3000 Ci/mmol) in a total volume of 25 µl. After incubation the samples were processed as for cdk4 determination.

Preparation of GST-p21^{CIP} and GST-pRb

P21^{CIP} cDNA was inserted in pGEX-KG vector in NdeI-HindIII sites. pGEX-SG-pRb was a gift from Dr. Wang (San Diego). Recombinant proteins were expressed in BL21 pLysE strain *Escherichia coli* transformed with either pGEX-KG-p21^{CIP} or pGEX-SG-pRb. Induction and purification of the recombinant proteins was made as described by Neet and Hunter.³⁶

{¹²⁵I}-GSTp21^{CIP} overlay analysis

NM proteins were separated electrophoretically in SDS-PAGE gels and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore) for 2 h at 60 V. The sheets were blocked in phosphate buffered saline (PBS), 5% defatted milk powder for 1 h at room temperature and incubated with {¹²⁵I}-GSTp21^{CIP} as described by Bachs and Carafoli.³⁷

Fixation, embedding and antigen retrieval autoclave heating technique

Fresh samples of liver tissue were cut into pieces and immediately fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h. Fixed livers were dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin blocks. 5 µm sections of each liver sample were cut and mounted on gelatin-coated slides. They were deparaffinized with xylene and then hydrated in decreasing concentrations of ethanol and rinsed in PBS. For each antibody slices were processed simultaneously and after endogenous peroxidase blocking procedures, they were placed in Coplin jars, immersed in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 and autoclaved for 10 min at 15 psi (121 °C). The slices were allowed to cool for a further 25 min, then rinsed in distilled water and in PBS. Treated slices were immunostained as described below.

Immunohistochemical staining method

The ABC detection system was used for immunostaining. Horse or goat serum, blocking kit to avoid non-specific binding of biotin-avidin system reagents, biotinylated secondary antisera, and avidin-biotin-horseradish peroxidase (ABC kits for mouse monoclonal or rabbit polyclonal antibodies) were obtained from Vector (Burlingame, CA). Immunohistochemical staining was performed as follows: After pre-treatment of the slices, a normal serum incubation (horse or goat) of 20 min was used to reduce non-specific background staining. Then, primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Incubations with the linking antibody (biotinylated anti-mouse or biotinylated anti-rabbit sera) and then the labeled ABC, each for 45 min followed. A 10 min rinse of the slices with PBS was carried out between each of the three incubations. Then, diaminobenzidine, as a chromogen was applied and incubated for 10 min. Finally, the slices were rinsed with PBS and mounted for examination. The negative control slices were treated in an identical manner except that the primary antibodies were omitted. For histological examination of liver samples, slices of each treatment (control and regenerating livers) were stained with hematoxylin-eosin according to conventional procedures.

Measurement of in vivo DNA synthesis

${}^3\text{H}$ -Thymidine was injected intraperitoneally at the dose of 0,5 Ci /g body weight (5Ci/mM; Radiochemical Center Amersham) 1 h before killing the animals. Autoradiography was performed as described by Baserga and Malamud.³⁸ Briefly, fresh liver tissue was cut into pieces and immediately fixed in 10% neutral buffered calcic-formalin for 24-72 h. Fixed livers were dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin blocks. 5 μm sections of each liver sample were cut and mounted on gelatin-coated slides. They were deparaffinized in xylene then hydrated in decreasing concentrations of ethanol and rinsed in distilled water. The slices were immersed into the nuclear emulsion Ilford L-4 (Ilford Limited) at 40-45°C and successively dried and exposed in darkness for three weeks at 4°C. After photographic processing (developing and fixing) the slices were stained with hematoxylin-eosin according to conventional procedures. Under light microscopic examination, the DNA-synthetic activity was estimated and expressed as the index of labelled hepatocytes (%).

TABLE I: Antibodies to Cell Cycle related proteins.

Target	Host	Specificity	Source	Code
CDK4 (IH)	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-260
CDK4	r	p	Clontech	3516-1
CYC D1 (IH)	m	m	Santa Cruz Biotech	sc-6281
CYC D	r	p	UBI	06-137
CYC D3 (IH)	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-182
p21 ^{CIP} (IH)	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-756
p21 ^{CIP}	g	p	Santa Cruz Biotech	sc-397G
p27 ^{KIP1}	r	p	J.Massagué (New York)	
p16 ^{ink4a}	m	m	Santa Cruz Biotech	sc-1661
CDK2	r	p	UBI	06-505
CYC E	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-481
CYC A	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-596
CDC25A	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-97
CDK7	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-857
CYC H	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-855
PCNA	m	m	Boehringer	1170406
p107	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-318
p130	r	p	Santa Cruz Biotech	sc-317

Abbreviations: Target: IH, immunochemistry. Hosts: r, rabbit; g, goat; m, mouse. Specificities: p, polyclonal; m, monoclonal. Source: Santa Cruz Biotech, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; UBI, Upstate Biotechnology.

Results

Activities of Cdk4 and Cdk2 During Rat Liver Regeneration.

To determine the activities of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration, 66% PHs were performed and livers excised at 5 h (mid G1), 13 h (late G1), 24 h (S phase) and 28 h (G2/M) after surgery. Livers were then homogenised and the activities of both cdks measured after IP as described under material and methods. As it can be seen in Fig 1A, the activity of cdk4 was undetectable in quiescent cells. At 13 h the activity was very low. Then, it was progressively increasing until 24 h when the activity was maximal. The kinetics of cdk2 activity was similar to that of cdk4, undetectable in quiescent cells and at 5 h after PH, the activity was low at 13 h, and it peaked at 24 h after PH (Fig. 1B).

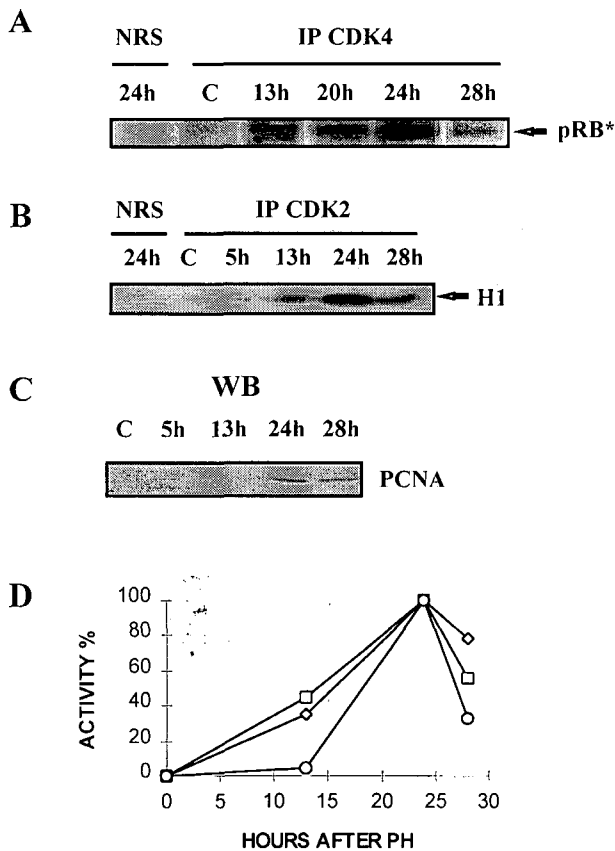


Figure 1. Time course of: (A) cdk4 activity, (B) cdk2 activity, (C) expression of PCNA, and (D) DNA synthesis after a PH. Cdk4 and cdk2 activities were measured by IP, followed by kinase assays using liver homogenates as described in Materials and Methods. IPs were performed using specific antibodies against cdk4 or cdk2 and normal rabbit serum (NRS) as a control. GST-pRb or histone H1 were used as exogenous substrates for cdk4 and cdk2, respectively. PCNA expression was studied by western blotting using 50 µg of homogenate. DNA synthesis was measured by autoradiography, as the incorporation of ^3H -thymidine into the DNA. DNA-synthetic activity was estimated and expressed as the index of labelled hepatocytes. Values of each point are the mean of five slices from three rats. The rate of DNA synthesis (---●---) and the activities of cdk4 (---■---) and cdk2 (---◆---) were expressed as the percentage of the maximal value.

The peaks of cdk4 and cdk2 activities correlated with both the expression of PCNA (a protein whose expression correlates with DNA synthesis since it is a cofactor of DNA polymerase δ) and the wave of DNA replication (Fig. 1C and 1D).

Levels of Proteins of the Cell Cycle Regulatory Machinery During Rat Liver Regeneration.

To identify the mechanisms involved in the activation of cdk4 and cdk2, the levels of different proteins of the cell cycle regulatory machinery were analysed at the times after PH mentioned above. Rat liver homogenates were obtained from normal and hepatectomized animals. Then, the samples were subjected to western blotting using specific antibodies against cdks: cdk4 and cdk2; cyclins: cyclins D1, D3, E and A; CKIs: p16^{ink4a}, p21^{CIP} and p27^{KIP1}; the cdk activators: cdc25A and CAK (cdk7 and cyclin H) and the pocket proteins p107, pRb and p130.

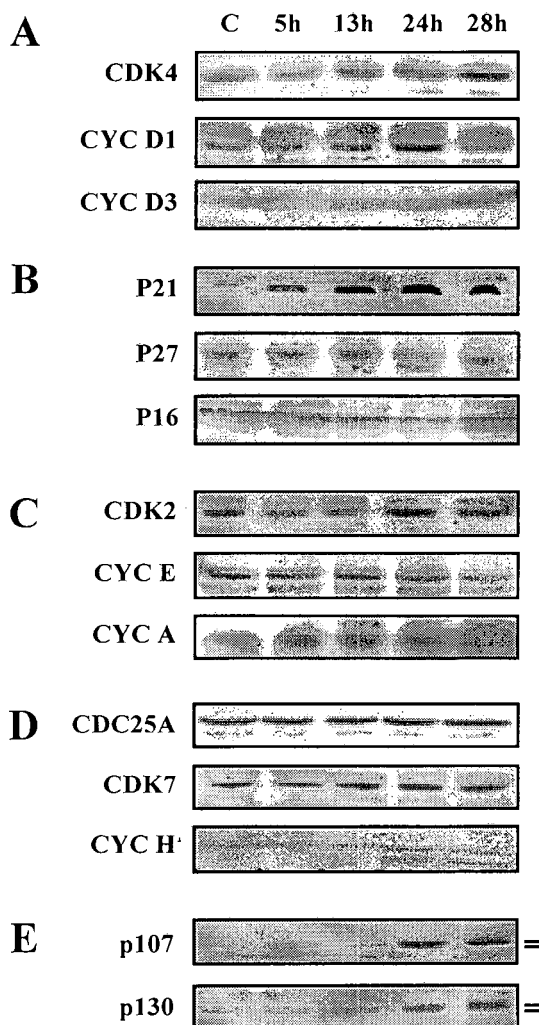


Figure 2. Levels of cell cycle regulatory proteins during rat liver regeneration. 50 μ g of liver homogenates from non-operated and hepatectomized rats were subjected to western blotting using antibodies against (A) cdk4, cyclins D1 and D3; (B) p21^{CIP}, p27^{KIP1}, and p16^{ink4a}; (C) cdk2, cyclins E and A; (D) cdc25A, cdk7, and cyclin H; (E) p107 and p130. Lower bars indicate the hypophosphorylated forms of p107 and p130. Upper bars indicate the hyperphosphorylated forms of these proteins.

As showed in Fig. 2A, quiescent liver cells contained significant levels of cdk4, cyclin D1 and cyclin D3. The amount of cdk4 remained constant until 5 h and then, slightly increased from 13 h to 28 h. The amount of cyclin D3 remained constant until at least 28 h post-PH whereas that of cyclin D1 showed a peak at 24 h after PH.

The amount of the CKIs p16^{ink4a}, p21^{CIP} and p27^{KIP1} were also measured by western blotting. Quiescent cells contained significant amounts of p16^{ink4a} and p27^{KIP1} but only very low amounts of p21^{CIP} (Fig. 2B). The levels of p16^{ink4a} remained constant until 28 h, whereas those of p27^{KIP1} were constant until 13 h and then decreased. The amount of p21^{CIP} was progressively increasing being maximal at 24-28h.

Quiescent cells also contained significant amounts of cdk2, cyclin E and cyclin A (Fig. 2C). The levels of cdk2 remained constant until 13 h and then slightly increased at 24 h. The amount of cyclin E was constant during the first 28 h after PH and the levels of cyclin A were progressively increasing from 5 to 28 h.

We also analysed whether the levels of cyclin H, cdk7 and cdc25A were modified after a PH. As showed in Fig. 2D, quiescent cells contained significant levels of all these proteins and their levels remained constant during all the cell cycle.

Since the main known substrates for G1/S cyclin-cdk complexes are the proteins of the pocket family (pRb, p107 and p130), we also analysed the levels and the phosphorylation status of these proteins during rat liver regeneration. Unfortunately, in spite of using a panel of different anti-pRb antibodies, we were not able to detect pRb neither in quiescent cells nor at any time after a PH. p130 was detected in quiescent cells and it was progressively increasing from 5 h to 28 h after PH (Fig. 2E). Changes in the mobility of p130, due to the increase in the phosphorylation were seen at 24 and 28 h after PH in coincidence with the induction of cdk4 and cdk2 activities. p107 was not present neither in quiescent cells nor at 5 and 13 h after PH but it was detected at 24 h and 28 h after PH. At these times after PH p107 was found to be phosphorylated here again in coincidence with the peaks of cdk4 and cdk2 activities.

This block of results indicate that during the first 13 h after PH significant amounts of the key proteins involved in the activation of cdk4 and cdk2 were present in liver cells. In spite of this fact neither cdk4 nor cdk2 were active. At 24 h both

kinases were activated. Although increases of cyclin D1 and cdk2 and a decrease of p27^{KIP1} were observed at this time after PH, the magnitude of these changes was not enough to justify the sudden activation of both kinases. Thus, to better understand how cdk4 activity was induced after a PH, analysis of the cyclin D-ckd4 complexes at different times after PH were subsequently performed.

Analysis of Cyclin D-Cdk4 Complexes During Rat Liver Regeneration

The status of cyclin D-ckd4 complexes at different times after PH was analysed by IP followed by western blotting. IP experiments using anti-ckd4 antibodies indicated that cyclin D3, p27^{KIP1} and p16^{ink4a} were associated to cdk4 in quiescent cells (Fig. 3A). On the contrary, neither cyclin D1 nor p21^{CIP} were found associated to cdk4 in these cells. At mid G1 (5 h after PH) no significant changes in the complexes were detected whereas at 13 h (late G1) in addition to cyclin D3, p27^{KIP1} and p16^{ink4a}, also cyclin D1 and p21^{CIP} were found associated to cdk4 (Fig. 3A). Later on, at 24 h and 28 h after PH, the complexes were similar to those observed at 13 h, although the levels of p27^{KIP1} associated to cdk4 were lower than those observed at 13 h.

IP experiments using antibodies against cyclin D1 or cyclin D3 confirm that in quiescent cells, cdk4 was associated to cyclin D3. Moreover, these IPs performed in quiescent revealed that low amounts of cyclin D1 were bound to cdk4 (Fig. 3B and 3C) and that low amounts of p21^{CIP} were bound to cyclin D3-ckd4 but not to cyclin D1-ckd4 complexes. The levels of cdk4 and p21^{CIP} associated to cyclins D1 and D3 were progressively increasing during the first 13 h after PH and then remained constant from 13 h to 28 h in both cases (Fig. 3B and 3C). As expected, IP experiments using anti-cyclin D1 or anti-cyclin D3 antibodies, indicate that p16^{ink4a} was not found associated to D-type cyclins-ckd4 complexes (Fig. 3B and 3C).

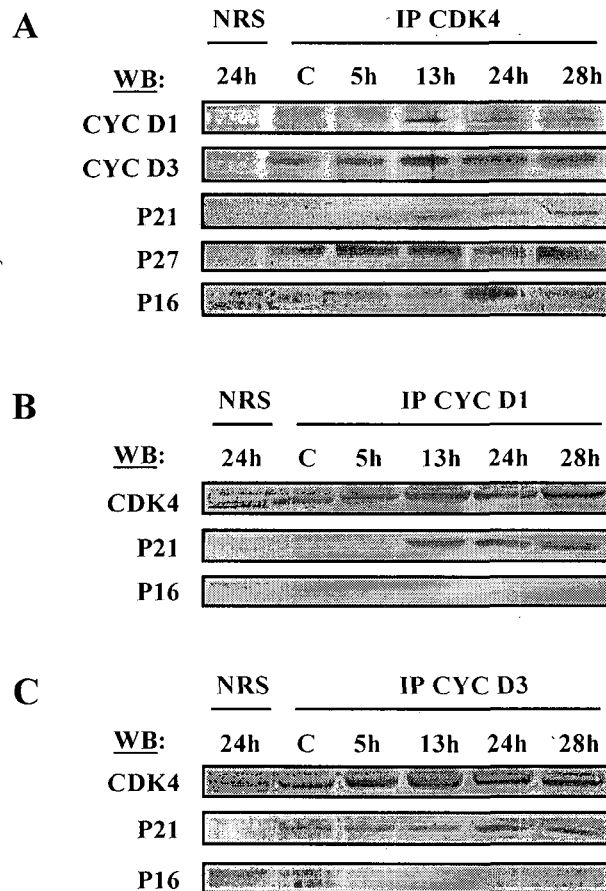


Figure 3. Analysis of cdk4, cyclin D1, and cyclin D3 complexes during rat liver regeneration. Liver homogenates were immunoprecipitated using antibodies against cdk4 (A), cyclin D1 (B) or cyclin D3 (C). The immunoprecipitates were subjected to western blotting analysis against cyclin D1, cyclin D3, p21^{CIP}, p27^{KIP1} and p16^{ink4a} (A) or against cdk4, p21^{CIP} and p16^{ink4a} (B and C). In all the cases a control was performed using a normal rabbit serum (NRS) to immunoprecipitate samples of 24 h regenerating livers.

Immunocytochemical Analysis of D-type Cyclins, Cdk4 and p21^{CIP} During Rat Liver Regeneration.

As mentioned above, quiescent cells contained significant levels of cyclin D3-cdk4 but only low levels of cyclin D1-cdk4 complexes. Whereas the levels of the former complexes were similar during the first 13 h after PH, the association of cyclin D1 with cdk4 was progressively increasing during liver regeneration. This association occurred without significant variations in the total levels of these proteins during this period of time. These facts suggested that the two D-type cyclins could display a different intracellular location in quiescent cells and that their location could be

modified during liver regeneration. Thus, immunocytochemical experiments to define the intracellular location of the D-type cyclins and cdk4 were performed using rat liver slices obtained from livers at different times after PH. As showed in Fig. 4, cdk4 and cyclin D3 were mainly located in the cytoplasm of quiescent cells, whereas cyclin D1 was totally nuclear. At 5 h after PH cdk4, and cyclin D3 were detected in both cytoplasm and nuclei. Interestingly, at this time after PH, all these proteins were significantly associated with the nuclear envelope, although staining in intranuclear domains was also observed. Fig. 5, shows amplified pictures of a typical nuclei at 5 h after PH stained with antibodies against every one of these proteins. Interestingly, cyclin D1 which was already nuclear at this time after PH, also displayed the same type of pattern than cyclin D3 and cdk4. At 13 h after PH and later on, all these proteins were mostly intranuclear and displayed similar patterns (Fig. 4). We also analysed the intracellular location of p21^{CIP} since a recent report suggested that it could be involved in the translocation of cyclin D-cdk4 from cytoplasm into the nucleus in epithelial cells.³⁹ As showed in Fig. 4, in quiescent cells p21^{CIP} was mostly cytoplasmatic although some staining in the nuclei was also observed. After PH, p21^{CIP} translocated into the nucleus in a similar way and timing that cyclin D3 and cdk4 did. Interestingly, p21^{CIP} also associated to the nuclear envelope at 5 h after PH (Fig. 5).

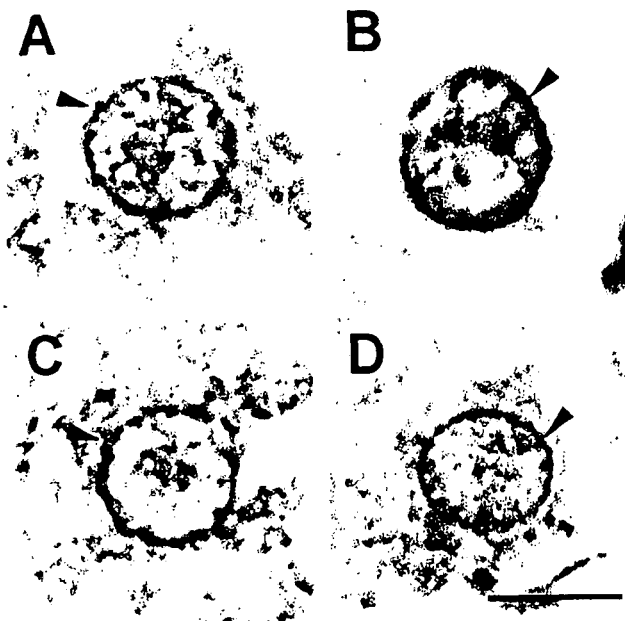


Figure 5.

Immunocytochemical detection of cell cycle regulatory proteins in rat liver nuclei from 5 h-hepatectomized rats. Liver sections from 5 h-hepatectomized rats were immunostained with antibodies against cdk4 (A), cyclin D1 (B), cyclin D3 (C) and p21^{CIP} (D). At this time after surgery, the intranuclear immune reaction is diffuse, with only a few aggregates visible. In all cases, the immunoreactivity is clearly associated with the nuclear envelope (arrowheads). Scale bar = 10 μ m.

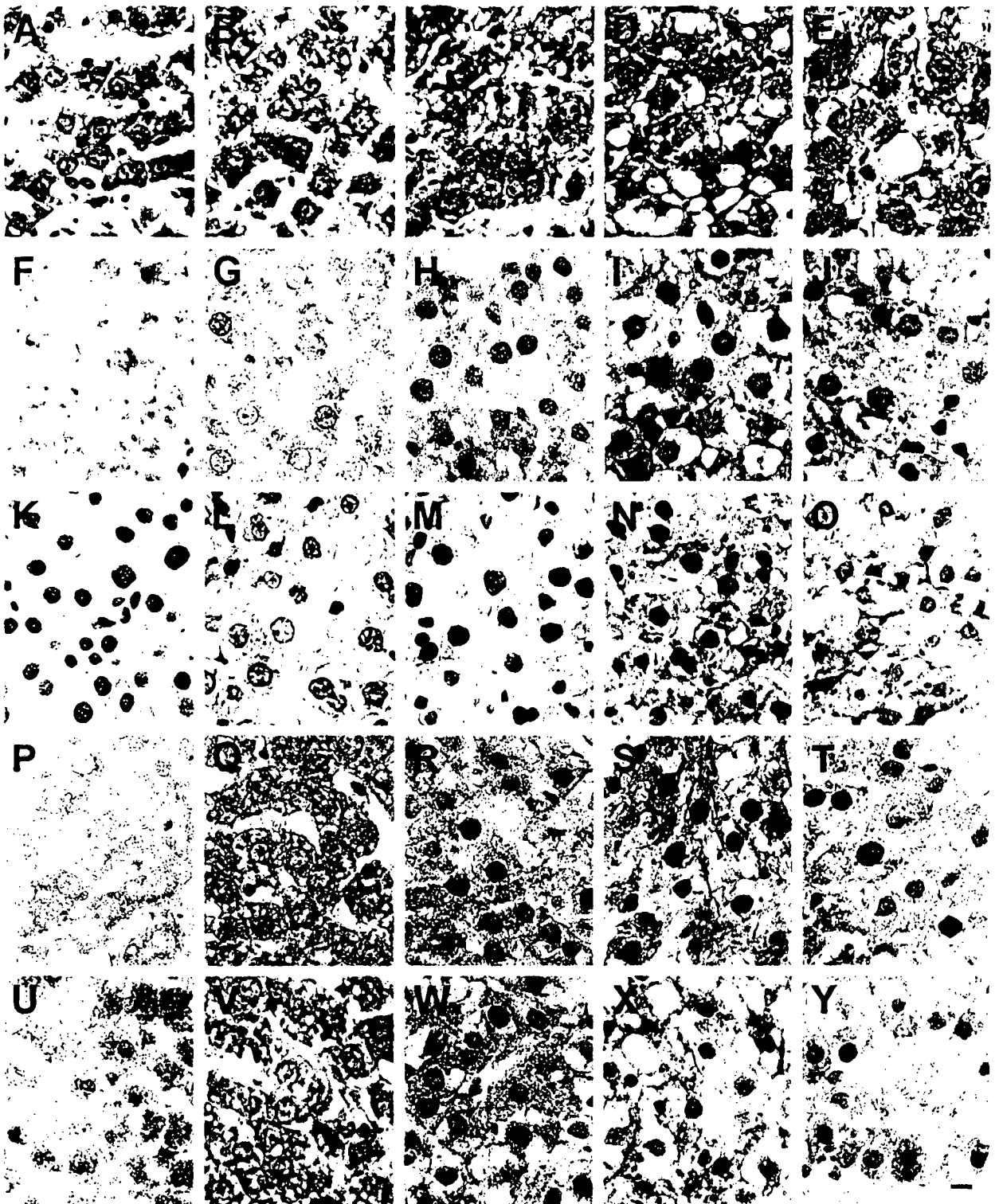


Fig. 4. Immunocytochemical detection of *cdk4*, cyclin D1, cyclin D3 and $p21^{CIP}$ during rat liver regeneration. Rat liver sections from control (A, F, K, P, and U) and hepatectomized rats at different times after surgery: 5 h (B, G, L, Q, and V), 13 h (C, H, M, R, and W), 24 h (D, I, N, S, X), and 28 h (E, J, O, T, and Y) were stained with hematoxylin-eosin (A-E), or immunostained with anti-*cdk4* (F-J), anti-cyclin D1 (K-O), anti-cyclin D3 (P-T), or anti- $p21^{CIP}$ (U-Y). Scale bar = 10 μ m.

Activities of Cdk4 and Cdk2 and Levels of the Proteins of the Cell Cycle Regulatory Machinery in Nuclear Sub-fractions During Rat Liver Regeneration

As mentioned above, at 13 h after PH cdk4, cyclin D1 and cyclin D3 were located in the nucleus and cyclin D1-cdk4 and cyclin D3-cdk4 complexes could be detected. In spite of these facts, cdk4 was not active at this time after PH. At 24 h, the activity of cdk4 was induced without significant changes in the amount of complexes. Thus, it could be possible that the intranuclear distribution of these proteins could be modified, in spite of the apparent similarity of the immunocytochemical patterns of these proteins at 13 h and 24 h after PH. To test this possibility, the activity of cdk4 and cdk2 and the levels of the cell cycle regulatory proteins were analysed in two nuclear sub-fractions named S1 and NM obtained as described under material and methods at different times after a PH.

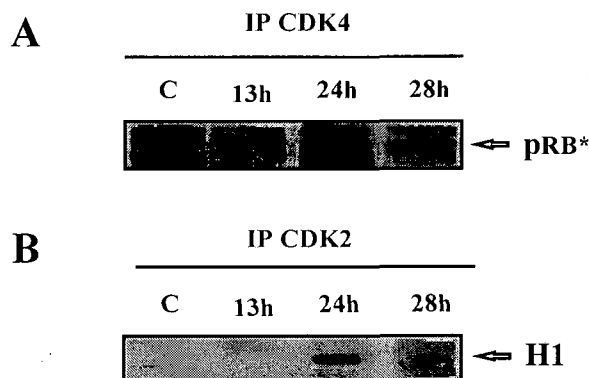


Figure 6. Time course of cdk4 (A) and cdk2 (B) activities in the S1 nuclear fraction after a PH. Cdk4 and cdk2 activities were measured by IP followed by kinase assays using the S1 nuclear fraction obtained as described in Materials and Methods. IPs were performed using specific antibodies against cdk4 or cdk2 GST-pRb or histone H1 were used as exogenous substrates for cdk4 and cdk2 activity, respectively.

Since S1 fraction is soluble and NM highly insoluble, we could only determine the activities of cdk4 and cdk2 using IP assays in the S1 fraction. Thus, instead of IP assays, we tried to determine cdk4 and cdk2 activities in the NM using a different approach. Thus, exogenous substrates and radioactive ATP were added to NM fractions and the phosphorylation of the exogenous substrates analysed after incubation. This type of experiments revealed the absence of cdk4 and cdk2 activities in the NM fractions (data not shown). As showed in Fig. 6A, the activity of cdk4 in

the S1 fraction was undetectable in quiescent cells and at 13 h after PH. It sharply increased at 24 h and subsequently decreased at 28 h after PH. The pattern of cdk2 activity was similar to that of cdk4 (Fig. 6B).

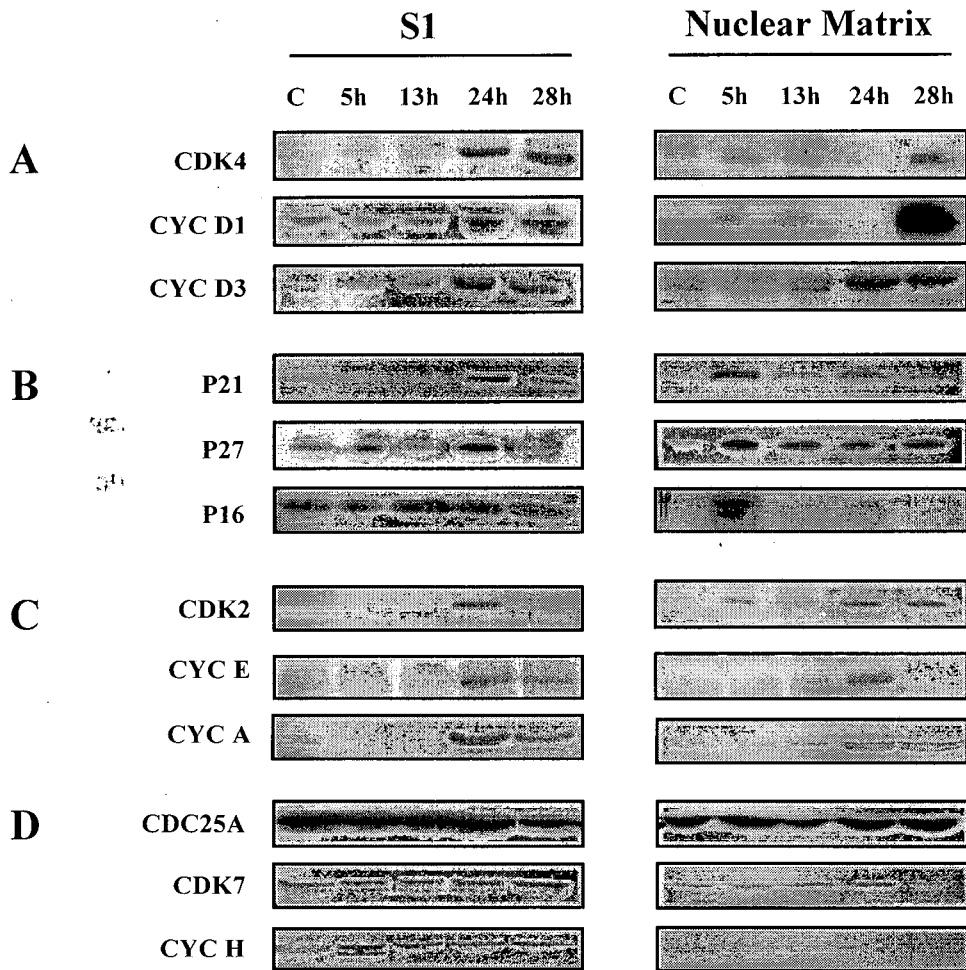


Figure 7. Levels of cell cycle regulatory proteins in nuclear sub-fractions during rat liver regeneration. S1 and nuclear matrix fractions from rat liver cells obtained at different times after a PH were obtained as described under materials and methods. 50 μ g of each sample were analysed by western blotting using antibodies against (A) cdk4, cyclin D1, and cyclin D3; (B) p21^{CIP}, p27^{KIP1}, and p16^{ink4a}; (C) cdk2, cyclin E and cyclin A; (D) cdc25A, cdk7, and cyclin H.

Quiescent cells contained low amounts of cdk4 in both S1 and NM (Fig. 7A). These results are in agreement with those observed by immunocytochemistry indicating that cdk4 was mostly cytoplasmatic in quiescent cells. The levels of cdk4 remained low until 13 h; then, sharply increased at 24 h and slightly decreased at 28 h

after PH. In NM, the amount remained constant until 24 h and at 28 h slightly increased.

Quiescent cells contained significant levels of cyclin D1 in S1 fraction but it was undetectable in NM (Fig. 7A). In the S1 fraction the amount of cyclin D1 remained constant from controls to 24 h and then sharply decreased by 28 h. In contrast, in NM the levels of cyclin D1 were low until 24 h to strongly increase at 28 h after PH. The levels of cyclin D3 in the S1 fraction were progressively increasing from control to 24 h and then slightly decreased at 28 h after PH. In NM, the levels of cyclin D3 remained constant until 13 h and then increased at 24-28 h (Fig. 7A).

We also analysed whether the levels of CKIs in the nuclear sub-fractions were modified after PH. As showed in Fig. 7B, S1 fractions from quiescent cells contained significant levels of p16^{ink4a} and p27^{KIP1}, but very low levels of p21^{CIP}. NM from quiescent cells did not contain p16^{ink4a} and only low levels of p21^{CIP} and p27^{KIP1} could be detected. The levels of p21^{CIP} and p27^{KIP1} displayed a similar pattern in the S1 fraction during liver regeneration, the levels of both inhibitors remained low until 13 h after PH, sharply increased at 24 h and then decreased by 28 h. In NM, both p21^{CIP} and p27^{KIP1} increased at 5 h, decreased at 13 h and then remained constantly low until 28 h after PH. The amount of p16^{ink4a} remained constant in S1 fraction from control to 28 h after PH. In the NM it was only significantly detected at 5 h after PH.

The levels of cdk2, cyclin E and cyclin A were also studied in both nuclear sub-fractions. As showed in Fig. 7C, quiescent cells did not contain cdk2 in the S1 fraction and only low levels in the NM. In the S1 fraction, the cdk2 levels remained low until 13 h, sharply increased at 24 h and then decreased at 28 h after PH. In NM the amount of cdk2 remained low during the first 13 h and then slightly increased at 24 h and 28 h after PH. In quiescent cells, the levels of cyclin E and A were low in both S1 and NM. They remained low until 13 h and then increased at 24-28 h in both fractions.

The levels of cdk7, cyclin H and cdc25A were also measured in both nuclear sub-fractions As it can be observed in Fig. 7D, significant levels of cdc25A and cdk7 were present in both S1 fraction and NM from quiescent cells. The amount of both proteins remained constant during all the cell cycle in both fractions. On the contrary,

cyclin H was only present in S1 fraction. Its amount was low in quiescent cells, increased at 5 h and then it remained constant until 28 h after PH.

Identification of p21^{CIP}-Binding Proteins in the Nuclear Matrix.

Since at 5 h after PH cyclin D3, cdk4, cyclin D1 and p21^{CIP} were associated to the nuclear envelope, we decided to analyse whether putative p21^{CIP}-binding proteins were present in this cellular structure. Since NM fractions contained the insoluble proteins of the nuclear envelopes, we decided to perform $\{^{125}\text{I}\}$ GST-p21^{CIP} overlay analysis on NM fractions obtained from quiescent liver cells and from livers at different times after a PH. Results revealed that a protein of 70 kDa (p70) was able to bind $\{^{125}\text{I}\}$ GST-p21^{CIP} in NM samples from quiescent cells and from samples at 5 h after PH (Fig. 8). On the contrary, NM fractions from 13 h, 24 h and 28 h after PH did not bind $\{^{125}\text{I}\}$ GST-p21^{CIP}.

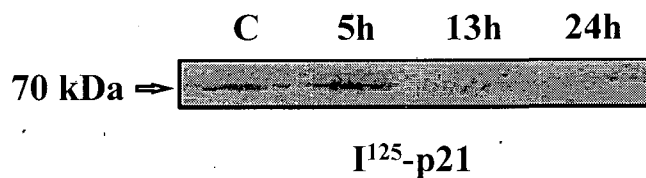


Figure 8. Identification of p21^{CIP}-binding proteins in the nuclear matrix. Nuclear matrix samples from rat liver cells obtained at different times after a PH were subjected to $\{^{125}\text{I}\}$ -GSTp21^{CIP} overlay analysis to identify p21^{CIP}-binding proteins. 50 μg of each sample were electrophoresed and then transferred to Immobilon-P membranes. The sheets were then incubated with $\{^{125}\text{I}\}$ -GSTp21^{CIP}, washed and the p21^{CIP}-binding proteins identified by autoradiography.

Discussion

Results reported here indicate that quiescent rat liver cells contain significant amounts of most of the main G1/S cell cycle regulatory proteins: D-type cyclins and cdk4, cyclin E, cyclin A and cdk2, the activators cyclin H-cdk7 and cdc25A and the inhibitors p16^{ink4a} and p27^{KIP1}. The only exception is the inhibitor p21^{CIP} which is present in very low amounts in quiescent cells. These results are in agreement with

those showed in previous reports in which the amount of some of these proteins were also measured during rat liver regeneration.²⁸⁻³¹ In spite of the presence of cdk4, cdk2 and their regulatory subunits, both kinases were inactive in quiescent cells. The presence of almost all of the G1/S cell cycle regulatory proteins in quiescent cells is an unusual phenomenon since in most of the cellular types analysed, quiescent cells lack all the G1/S cyclins (D-type cyclins, cyclin E and cyclin A).^{27, 40-43} The reason why quiescent liver cells contain significant amounts of all the G1/S cyclins is not known but it could be related to the capability of liver tissue to rapidly respond to toxic injury in order to recover the lost hepatic mass.

After PH both cdk4 and cdk2 activities were induced, showing maximal activities at 24 h after surgery. Although we were not able to detect pRb in rat liver cells we could show that the increase of both cdk4 and cdk2 activities correlate with the phosphorylation of p130 and p107 (the two other members of the pocket family of proteins which are physiological substrates of both cdks), with the expression of PCNA and p107 (whose expression depends on E2F-transcription factors),^{44,25} and with DNA replication.

A reduced number of changes in the total levels of G1/S regulatory proteins were also observed after PH. The most relevant of these changes were the progressive increase of p21^{CIP}, the decrease of p27^{KIP1} at 24-28 h, the peak of cyclin D1 at 24 h, and the increase of cdk2 at 24-28 h after PH. Both the decrease of p27^{KIP1} and the increase of cyclin D1 correlate with the peak of cdk4 activity observed at 24 h after PH. The increase of cdk2 at 24 h correlates with the peak of cdk2 activity. In spite of this correlation it do not seems that changes in the total amount of these cell cycle regulatory proteins could be responsible of the induction of cdk4 and cdk2 activities since significant amounts of all these proteins were also found during the early G1 when cdk4 and cdk2 were inactive.

The IP experiments performed to analyse the status of the cyclin D-cdk4 complexes revealed that at least three types of complexes were already present in quiescent liver cells: cyclin D3-cdk4-p27^{KIP1}, p16^{ink4a}-cdk4 and cyclin D1-cdk4-p27^{KIP1}. The latter being present in very low amounts. Some of the cyclin D3-cdk4 complexes present in quiescent cells also contained p21^{CIP}. We do not know whether quaternary complexes containing cyclin D3-cdk4-p27^{KIP1}-p21^{CIP} exist or whether there

exist two different types of ternary complexes: cyclin D3-cdk4-p27^{KIP1} and cyclin D3-cdk4-p21^{CIP}. Although these complexes are inactive in quiescent liver cells, the existence of these complexes during quiescence is an unusual phenomenon, different to what it has been previously described to occur in a number of different cellular types including T-lymphocytes, macrophages, fibroblasts and epithelial cells.^{45, 20} In these cellular types it is assumed that quiescent cells contain very low levels of D-type cyclins. Upon stimulation by growth factors the expression of D-type cyclins increase and then cyclin D-cdk4 complexes can be formed. The assembly of cyclin D-cdk4 complexes requires an still unknown assembly factor whose activity is also induced by mitogens.^{20, 21} Consequently, quiescent rat liver cells do not need mitogenic activation neither to synthesise D-type cyclins nor for assembling cyclin D-cdk4 complexes.

The presence of significant levels of cyclin D3-cdk4 complexes but very low levels of cyclin D1-cdk4 complexes in quiescent liver cells can be explained by the fact that cyclin D1 is nuclear and cyclin D3 cytoplasmatic in these cells. Thus, since cdk4 was located in the cytoplasm, only cyclin D3-cdk4 complexes can be formed in quiescent cells.

The levels of p21^{CIP} were low in quiescent cells, but they were increased after PH. These results are similar to that occurring in several other cellular types when activated to proliferate.¹⁸ This increase of p21^{CIP} correlates with its association to cyclin D-cdk4 complexes, suggesting that as soon as p21^{CIP} was synthesised it associated to cyclin D-cdk4 complexes, firstly to cyclin D3-cdk4, and subsequently to cyclin D1-cdk4. Cyclin D3-cdk4-p21^{CIP} complexes were firstly cytoplasmatic and then translocated into the nucleus by 5 h after PH. In a first step, these complexes associated to the nuclear envelope. Subsequently, they were released into the nucleus at 13 h after PH. The association of these complexes to the nuclear envelope could be mediated by a 70 kDa protein (p70), present in the NM fractions, which was found to be able to bind p21^{CIP} by overlay analysis. Although it still remains to be proved, one can speculate that at 5 h after PH, p70 associated not only to p21^{CIP} but also to p21^{CIP}-cyclin D3-cdk4 complexes. It seems also possible that cyclin D1 (which is already nuclear in quiescent cells) could also associate as cyclin D1-cdk4-p21^{CIP} complexes to p70, since at 5 h after PH cyclin D1 showed a immunocytochemical pattern similar to