

Cycle cellulaire et contrôle de l'autorenouvellement des cellules embryonnaires souches

par Pierre Savatier & Marielle Afanassieff

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5665, INRA LA913, École Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07

Reçu le 20 juin 2001

RÉSUMÉ

L'autorenouvellement des cellules embryonnaires souches (cellules ES) est contrôlé par la voie de signalisation LIFR β /gp130 qui active le facteur de transcription STAT3 et inhibe la différenciation. Les cellules ES possèdent des caractéristiques de croissance qui les différencient fondamentalement de tous les autres types cellulaires constituant l'organisme embryonnaire, fœtal ou adulte. Il semble que le contrôle de leur cycle mitotique ne repose ni sur la voie de signalisation passant par les MAPKinases, ni sur la régulation de la phosphorylation de la protéine

du rétinoblastome par les complexes cycline D:CDK4. Cette régulation dépendante des MAPKinases et des cyclines D est vraisemblablement acquise lors de la différenciation. Nous proposons l'existence d'une interaction fonctionnelle entre la voie LIFR β /gp130 et la machinerie de régulation de la transition G1/S. Cette interaction permettrait à la cellule souche de s'affranchir des signaux mitogènes extracellulaires et lui permettrait d'obéir à un mécanisme intrinsèque de contrôle du cycle mitotique favorisant sa prolifération et son autorenouvellement.

SUMMARY Cell cycle control and self-renewal of pluripotent embryonic stem cells

On one hand, self-renewal of mouse embryonic stem (ES) cells rely exclusively upon the LIFR β /gp130-signaling pathway and the subsequent activation of the STAT3 transcription factor. On the other hand, the much-studied cellular machinery, that is organized to collect extracellular signals, transduce them via tyrosine kinase receptors and the SOS-RAS-RAF-MEK-MAPK pathway, ultimately leading to regulation of D-type cyclin expression, while regula-

tion of the retinoblastoma (RB) protein phosphorylation is likely not to be operative in ES cells. We hypothesize that ES cells are blinkered by the lack of RB-dependent control of the G1/S transition, and that commitment into differentiation triggers the birth of a regulatable G1 phase. We discuss how the LIFR β /gp130-signaling pathway and the ES cell-cycle machinery may functionally interact to promote self-renewal.

INTRODUCTION

Les cellules embryonnaires souches (cellules ES) dérivent du bouton embryonnaire qui, avec le trophoblaste, forme le blastocyste pré-implantatoire. Les cellules ES possèdent trois caractéristiques qui les différencient fondamentalement de tous les autres types cellulaires de l'organisme embryonnaire, fœtal ou adulte : *i*) elles sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier dans tous les types cellulaires composant l'organisme adulte, et elles contribuent également à la formation de certains tissus extra-embryonnaires (mésoderme amniotique, viscéral et allantoïdien, ectoderme amniotique) (Beddington & Robertson, 1989); *ii*) elles possèdent une activité télomérase élevée et peuvent pro-

liférer de façon infinie sans perdre leurs potentialités de différenciation (Pera *et al.*, 2000); *iii*) elles possèdent un caractère tumoral, c'est-à-dire qu'elles sont capables de former des tératocarcinomes lorsqu'elles sont isolées du contexte embryonnaire. Cette capacité des cellules ES à générer des tératocarcinomes est une propriété intrinsèque des cellules souches embryonnaires puisque les cellules du bouton embryonnaire et les cellules de l'épiblaste de l'embryon post-implantatoire peuvent aussi générer des tératocarcinomes expérimentaux (Stevens, 1970). Cette propriété est surprenante dans la mesure où les cellules ES, contrairement à toutes les autres cellules néoplasiques, ne possèdent pas de mutations dans les gènes de contrôle de la prolifération. L'origine de cette propriété se situe probablement dans les mécanismes de

contrôle du cycle cellulaire, en particulier ceux régulant la phase G1 et la transition G1/S.

Ces trois propriétés constituent une carte d'identité physiologique des cellules ES de Souris, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal connus. Nous ferons le point sur les connaissances actuelles concernant la régulation de la croissance des cellules ES et nous tenterons d'établir un lien entre la régulation du cycle cellulaire et le contrôle de leur auto-renouvellement.

LA VOIE DE SIGNALISATION LIF/gp130 CONTRÔLE L'ÉQUILIBRE AUTORENOUVELLEMENT-DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ES

Les cellules ES de Souris requièrent une cytokine, le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) pour se maintenir en auto-renouvellement *in vitro* (Nichols *et al.*, 1990). La fixation du LIF provoque l'hétérodimérisation du récepteur LIFR β avec le transducteur gp130, puis le recrutement de kinases de type JAK qui phosphorylent et activent le facteur de transcription STAT3 (Burdon *et al.*, 1999a). L'inhibition de STAT3 grâce à un mutant dominant négatif, induit la différenciation des cellules ES (Niwa *et al.*, 1998). À l'inverse, l'expression d'un mutant STAT3 constitutivement actif contraint la cellule ES à s'autorenewer et cela même en l'absence de LIF exogène (Matsuda *et al.*, 1999). Ainsi, l'activation du facteur STAT3 est nécessaire et suffisante pour assurer l'auto-renouvellement des cellules ES de Souris.

L'hétérodimérisation du récepteur LIFR β avec le transducteur gp130 induit également le recrutement de la tyrosine-phosphatase SHP-2, la phosphorylation par les kinases JAK et l'activation des protéines ERK1 et ERK2 (Fukada *et al.*, 1996; Burdon *et al.*, 1999b). Cependant, cette deuxième voie de transduction dépendante de gp130 n'est pas nécessaire à la croissance et à l'auto-renouvellement des cellules ES. Au contraire, l'activation des protéines ERK dépendante de l'interaction gp130-SHP-2 stimule leur différenciation (Burdon *et al.*, 1999b).

Ainsi, la signalisation dépendante de gp130 stimule à la fois la prolifération (via STAT3) et la différenciation (via ERK1,2). Une régulation très fine de ces deux voies effectrices permet aux cellules ES de contrôler l'équilibre auto-renouvellement-différenciation (Burdon *et al.*, 1999a) (Fig. 1).

LA SIGNALISATION DÉPENDANTE DE LA VOIE RAS \rightarrow RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK NE CONTRÔLE PAS L'AUTORENOUVELLEMENT DES CELLULES ES

La voie Grb2-SOS \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK joue un rôle clé dans la régulation de la croissance des cellules non transformées. En réponse aux signaux mitogènes extracellulaires, elle régule la synthèse des cyclines

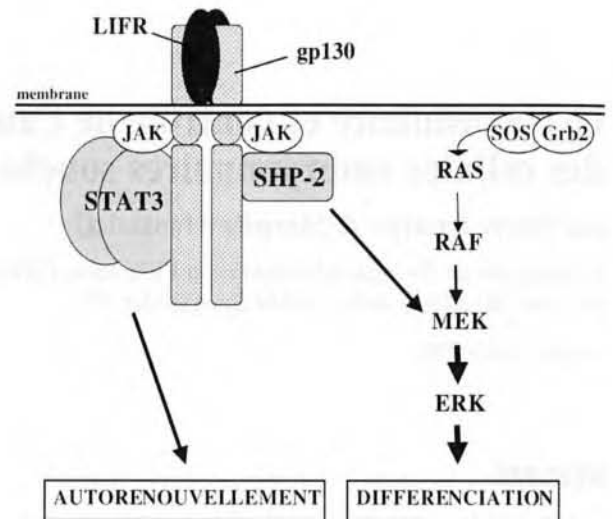


FIG. 1. – Représentation schématique de la voie de transduction LIFR/gp130 dans les cellules ES.

de la phase G1 (Kerkhoff & Rapp, 1997), leur assemblage avec les sous-unités catalytiques, les Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK), et l'activité des complexes cycline-CDK ainsi formés (Cheng *et al.*, 1998a). L'inhibition de l'interaction gp130-SHP-2 bloque totalement l'activation des protéines ERK mais n'a aucun effet sur la croissance cellulaire (Burdon *et al.*, 1999b). L'élimination de la protéine SHP-2 des cellules ES, grâce à l'inactivation des deux allèles du gène, n'affecte pas leur prolifération mais inhibe partiellement leur différenciation (Qu & Feng, 1998). De même, l'élimination de la protéine adaptatrice Grb2 n'a aucun effet sur la croissance mais bloque totalement la différenciation (Cheng *et al.*, 1998b). Enfin, les cellules ES sont insensibles à l'inhibition pharmacologique des protéines MEK (Jirmanova *et al.*, soumis).

Ces observations démontrent que la signalisation Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK n'est pas nécessaire à l'auto-renouvellement des cellules ES mais qu'en revanche, elle est requise pour leur différenciation (Fig. 1).

LE CONTRÔLE DE LA TRANSITION G1/S DANS LES CELLULES ES N'EST PAS DÉPENDANT DE LA VOIE "CYCLINE D-CDK4 \rightarrow RB-E2F"

La protéine du rétinoblastome (RB) joue un rôle clé dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Durant la première partie de la phase G1, la protéine RB hypophosphorylée inhibe l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S en s'associant aux facteurs de transcription de la famille E2F et en les inactivant. À l'approche du point de restriction, la protéine RB est phosphorylée de façon séquentielle, d'abord par les complexes cycline D-CDK4 ou cycline D-CDK6, puis par les complexes cycline E1-CDK2 ou cycline E2-CDK2. Cette phosphorylation conduit à la libération des

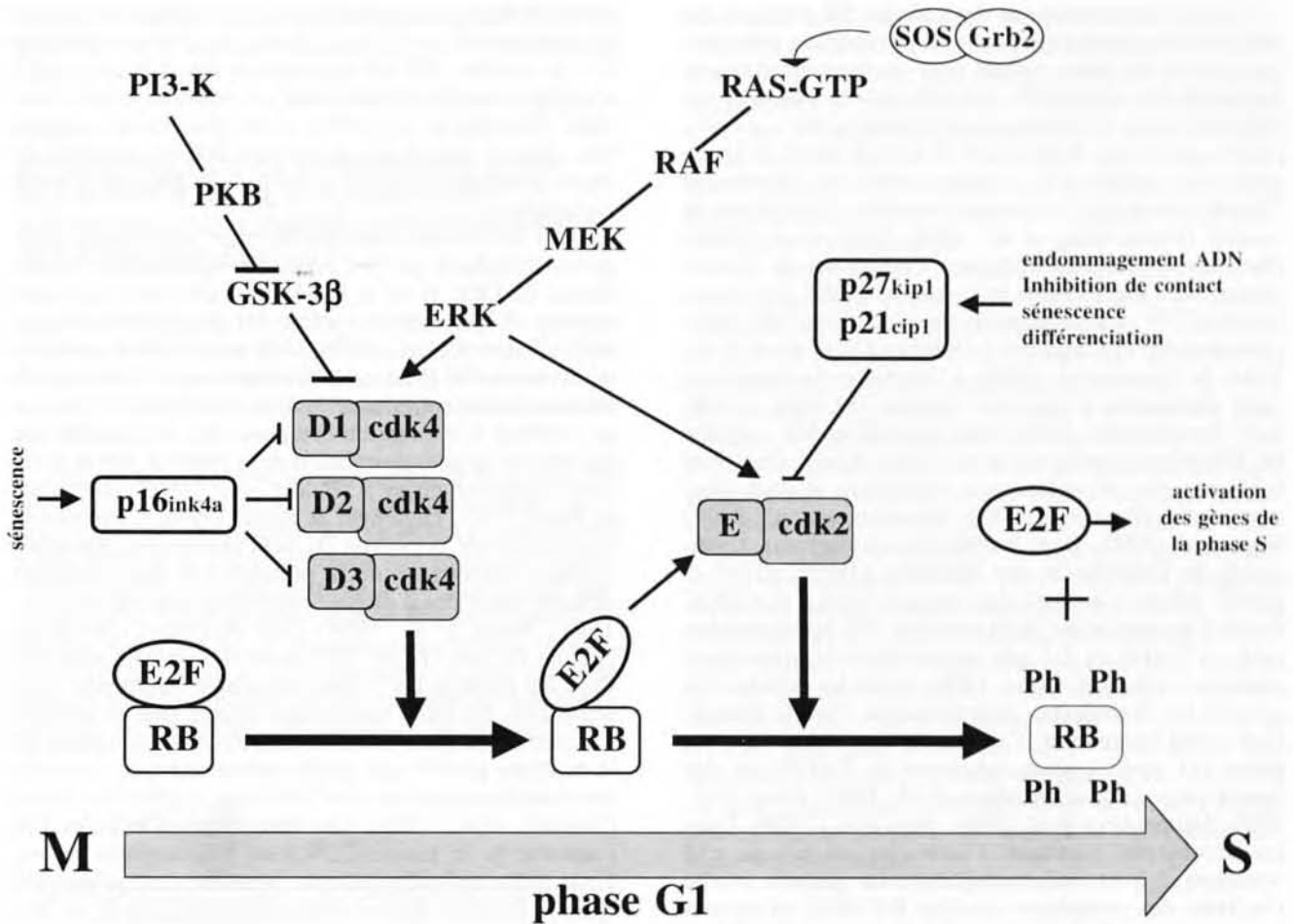


FIG. 2. – Représentation schématique de la régulation de la phosphorylation de la protéine RB et de la transition G1/S.

facteurs E2F et l'activation des gènes de la phase S (Weinberg, 1995; Dyson, 1998; Harbour & Dean, 2000). L'activité des complexes cycline-CDK peut être atténuée, voire inhibée, par les inhibiteurs de kinases en réponse à l'endommagement de l'ADN (p21^{cip1}), l'inhibition de contact (p27^{kip1}) ou à la sénescence répliquative (p16^{ink4a}, p21^{cip1} et p19^{ARF}) (Sherr & Roberts, 1999) (Fig. 2). Les gènes codant pour les divers composants de la voie cycline D-CDK4 → RB-E2F sont l'objet de mutations dans divers types de tumeurs comme les rétinoblastomes, les ostéosarcomes, les cancers du sein, de la prostate et du poumon à petites cellules (Hall & Peters, 1996; Sherr, 1996; Bartek *et al.*, 1997; Bartkova *et al.*, 1997), ce qui atteste de l'importance de cette voie de régulation dans le contrôle du cycle mitotique. Dans certaines tumeurs ne comportant pas de mutation du gène *Rb*, on observe une expression constitutive des cyclines D ou de la cycline E, induisant une phosphorylation constitutive de la protéine RB (Motokura *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1994; Hall & Peters, 1996).

Plusieurs observations suggèrent que la voie "cycline D-CDK4 → RB-E2F" n'est pas fonctionnelle dans les cellules ES :

– *i*) nous avons montré que les cellules ES sont résistantes à l'effet inhibiteur de croissance de la protéine inhibitrice de kinase, p16^{ink4a} (qui inactive spécifiquement les kinases CDK4 et CDK6) (Savatie *et al.*, 1996). La résistance à l'effet antiprolifératif de p16^{ink4a} est une propriété cardinale des cellules tumorales dont la voie "cycline D-CDK4 → RB-E2F" est inactivée par des mutations (Medema *et al.*, 1995; Lukas *et al.*, 1995). Les cellules ES acquièrent la sensibilité à l'effet inhibiteur de croissance de p16^{ink4a} après induction de la différenciation (Savatie *et al.*, 1996);

– *ii*) les caractéristiques de croissance et d'autorenouvellement des cellules ES *Rb*^{-/-}, *p107*^{-/-}, *p130*^{-/-} (cellules ES "Triple Knock-Out" dans lesquelles les gènes codant pour les trois membres de la famille RB ont été inactivés par recombinaison homologue) sont identiques à celles des cellules ES non mutantes. En revanche, les cellules ES "Triple Knock-Out" sont altérées dans leur capacité de différenciation. Elles génèrent des tératocarcinomes expérimentaux dans lesquels la fréquence des cellules neuronales et musculaires est fortement diminuée au profit des cellules souches indifférenciées (Danenberg *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2000);

– *iii*) le cycle mitotique des cellules ES présente des analogies frappantes avec celui de fibroblastes embryonnaires dont les gènes codant pour les trois membres de la famille RB (RB, p107 et p130) ont été inactivés par recombinaison homologue (fibroblastes *Rb^{-/-}*, *p107^{-/-}*, *p130^{-/-}* ou “Triple Knock-Out”). Tout d’abord, la croissance des cellules ES – comme celle des fibroblastes “Triple Knock-Out” – n’est pas sensible à l’inhibition de contact (Dannenber *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2000). Dans les fibroblastes normaux, l’inhibition de contact repose sur l’inactivation de la kinase CDK4 par l’inhibiteur p27^{kip1}, l’accumulation de la protéine RB hypophosphorylée et l’arrêt des cellules en G1 (Polyak *et al.*, 1994; St. Croix *et al.*, 1998). L’inhibition de contact est donc dépendante d’une voie “cycline D-CDK4 → RB-E2F” fonctionnelle. D’autre part, les cellules ES – comme les fibroblastes embryonnaires “Triple Knock-Out” – ne subissent pas de sénescence répliquative et sont donc immortelles (Pera *et al.*, 2000; Dannenberg *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2000). Dans les fibroblastes normaux, l’activation de l’expression des protéines p16^{ink4a}, p21^{cip1} et p19^{ARF} inhibe l’activité des kinases CDK2 et CDK4, induit l’accumulation de la protéine RB hypophosphorylée et l’arrêt en G1 qui caractérisent la sénescence répliquative (Stein & Dulic, 1998). Enfin les cellules ES, comme les fibroblastes embryonnaires “Triple Knock-Out”, sont incapables d’arrêter le cycle mitotique en phase G1 après endommagement de l’ADN par des agents génotoxiques (Aladjem *et al.*, 1998; Prost *et al.*, 1998; Dannenberg *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2000). Dans les fibroblastes normaux, l’activation de la voie p53 consécutive à un endommagement du génome inhibe l’activité des complexes cycline E-CDK2, et permet l’accumulation de la protéine RB hypophosphorylée et l’arrêt du cycle mitotique en phase G1 (Agarwal *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 1998). Ce point de contrôle, dépendant d’une voie RB-E2F fonctionnelle, est donc absent dans les cellules ES. En revanche, le point de contrôle en phase G2 – qui n’est pas dépendant de la voie RB-E2F – est conservé aussi bien dans les cellules ES que dans les fibroblastes “Triple Knock-Out” (Aladjem *et al.*, 1998; Prost *et al.*, 1998; Dannenberg *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2000).

En conclusion, les cellules ES présentent au moins quatre propriétés cardinales de cellules dont le contrôle du cycle mitotique n’est pas sous la dépendance de la voie “cycline D-CDK4 → RB-E2F” : *i*) insensibilité aux inhibiteurs de CDK4, *ii*) absence d’inhibition de contact, *iii*) absence de sénescence répliquative, et *iv*) absence de point de contrôle dépendant de p53 en phase G1.

LA PROTÉINE RB EST-ELLE CONSTITUTIVEMENT PHOSPHORYLÉE DANS LES CELLULES ES ?

Les cellules ES sont caractérisées par une phase G1 très courte (< 1,5 hr). Elles expriment la protéine RB

mais l’isoforme non phosphorylée est indétectable lors de la transition M → G1 → S. Ainsi, dès l’entrée en phase G1, la protéine RB est rephosphorylée et la cellule ES s’engage immédiatement dans un nouveau cycle mitotique (Savatier *et al.*, 1994). Cette observation suggère que, dans la cellule ES, la protéine RB est inactivée de façon permanente par un processus de phosphorylation constitutive.

Dans les cellules non transformées, les signaux mitogènes transduits par les voies de signalisation dépendantes de ERK et de la PI3-Kinase activent *i*) la transcription du gène de la cycline D1 (Kerkhoff & Rapp, 1997; Takuwa *et al.*, 1999), *ii*) la traduction des ARNm de la cycline D1 (Muisse-Helmericks *et al.*, 1998) et *iii*) la formation des complexes cycline D1-CDK4 (Cheng *et al.*, 1998a). L’expression ectopique des cyclines D1 ou D2 stimule la phosphorylation de la protéine RB et accélère l’entrée en phase S (Baldin *et al.*, 1993; Resnitzky & Reed, 1995; Herzinger & Reed, 1998). L’expression constitutive de la cycline D1 peut induire une phosphorylation constitutive de la protéine RB dans certaines cellules tumorales d’origine cancéreuse (Motokura *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1994; Hall & Peters, 1996). La cycline D1 (ou D2 ou D3) joue-t-elle un rôle similaire dans les cellules ES? Cette hypothèse paraît peu vraisemblable. En effet, nous avons montré que les cellules ES sont insensibles à l’effet inhibiteur de croissance de la protéine p16^{ink4a} qui inhibe spécifiquement l’activité des complexes cycline D-CDK4 (ou cycline D-CDK6) (Savatier *et al.*, 1996). De plus, dans les cellules ES, l’activité de la kinase CDK4 est extrêmement faible. Cette faible activité résulte de l’absence des cyclines D2 et D3 et d’un très faible niveau d’expression de la cycline D1. Cette cycline D1 résiduelle ne semble être détectée que dans le cytoplasme, ce qui exclut a priori un rôle dans la régulation de la phosphorylation de la protéine RB qui a lieu dans le noyau de la cellule en phase G1 (Savatier *et al.*, 1996).

Il faut alors envisager une autre hypothèse, celle selon laquelle la phosphorylation constitutive de la protéine RB dans les cellules ES résulterait d’une expression constitutive de la cycline E (E1 ou E2). Dans les cellules non tumorales, l’expression forcée de la cycline E est suffisante pour libérer la cellule d’un blocage du cycle mitotique imposé par la surexpression de l’inhibiteur p16^{ink4a} (spécifique de CDK4 et CDK6). Ceci démontre que l’activité des complexes cycline D-CDK4,6 n’est pas nécessaire pour la progression dans le cycle mitotique lorsque la cycline E est exprimée de façon constitutive (Lukas *et al.*, 1997). Cette conclusion est confortée par les résultats d’un “knock-in” de la séquence codante de la cycline E dans le locus du gène de la cycline D1, qui montrent que l’expression de la cycline E sous le contrôle des éléments régulateurs du gène de la cycline D1 permet de corriger le phénotype mutant des souris D1^{-/-} (Geng *et al.*, 1999). On en conclut que la fonction majeure, sinon exclusive, des complexes cycline D-CDK4 est d’activer l’expression du gène de la cycline E. Dans les cellules ES, l’expression constitutive de la cycline E permet-

trait de s'affranchir de la voie "cycline D-CDK4 → RB-E2F" et d'assurer la phosphorylation constitutive de la protéine RB.

LE CONTRÔLE DE LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE RB ET L'ÉQUILIBRE AUTORENOUVELLEMENT-DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ES (Fig. 3)

L'absence de contrôle de la transition G1/S par la voie "cycline D-CDK4 → RB-E2F" joue-t-elle un rôle dans le maintien des cellules ES en état d'autorenouvellement? Deux arguments indirects viennent étayer cette hypothèse :

– des cellules ES dont les trois gènes de la famille RB (RB, p107 et p130) ont été inactivés par recombinaison homologue ont des potentialités de différenciation fortement diminuées. Elles génèrent des tératocarcinomes expérimentaux au sein desquels la différenciation neuronale et la différenciation musculaire sont quasiment abolies. En revanche, la proportion de cellules souches en prolifération est 15 fois supérieure à celle observée dans les tératocarcinomes de génotype non mutant (Danenberg *et al.*, 2000). Les protéines de la famille RB

sont donc impliquées indirectement dans le contrôle de l'équilibre autorenouvellement-différenciation des cellules ES. L'isoforme non phosphorylée de RB, grâce à sa capacité à se lier et à activer des facteurs de transcription, joue vraisemblablement un rôle clé dans l'induction de la différenciation. À l'inverse, il est vraisemblable que l'absence de l'isoforme non phosphorylée de RB lors de la transition M → G1 → S favorise l'autorenouvellement des cellules ES ;

– le faible niveau d'expression de la cycline D1 pourrait également jouer un rôle direct dans le maintien des cellules ES en autorenouvellement. En effet, la cycline D1 est capable de se lier au facteur STAT3 et d'inhiber son activité transcriptionnelle dans la lignée de cellules hépatocytaires HepG2. Cet effet est indépendant de l'association de la cycline D1 avec la kinase CDK4 et de la régulation de la phosphorylation de la protéine RB (Bienvenu *et al.*, 2001). De plus, on sait que l'activation du facteur STAT3 stimule la transcription du gène codant pour le facteur de transcription junB (Matsuda *et al.*, 1999 ; Sjin *et al.*, 1999). JunB est lui-même un répresseur transcriptionnel de la cycline D1 (Bakiri *et al.*, 2000). On peut donc postuler l'existence d'une boucle d'auto-inactivation dans laquelle STAT3 inhibe l'expression de la cycline D1 (*via* junB) qui elle-même a un effet antagoniste sur l'activité de STAT3. Bien que l'interaction STAT3-cycline D1 n'ait pas encore été mise en évidence dans les cellules ES, on peut en postuler l'existence et en anticiper l'importance dans le contrôle de l'équilibre autorenouvellement-différenciation.

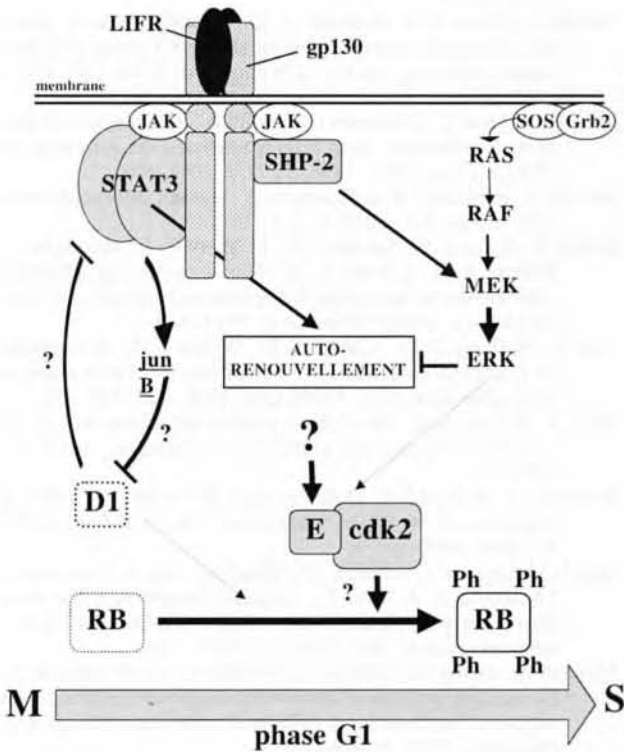


FIG. 3. – Hypothèses de régulation de la phosphorylation de la protéine RB et d'interaction fonctionnelle avec la voie LIF-gp130 dans les cellules ES. Les flèches pointillées indiquent les voies de régulation non existantes dans les cellules ES. Les cadres en pointillés correspondent à des protéines peu ou pas exprimées dans les cellules ES.

CONCLUSION

Il apparaît clairement que les mécanismes qui contrôlent le cycle mitotique des cellules ES sont fondamentalement différents de ceux identifiés dans les autres types cellulaires. En particulier, il est maintenant acquis que la machinerie cellulaire qui permet l'intégration des signaux mitogènes par les récepteurs à activité tyrosine kinase, puis leur transduction, *via* la voie Grb2-SOS → Ras → Raf → MEK → ERK pour aboutir à la régulation de la synthèse de la cycline D1 et la phosphorylation de la protéine RB, n'est pas opérationnelle dans les cellules ES. Cette voie de contrôle est mise en route lors de la différenciation. On peut imaginer que l'absence d'un contrôle du cycle cellulaire dépendant de la voie Ras → MAPK → cycline D-CDK4 → RB-E2F permet à la cellule ES de se soustraire aux signaux antimitotiques et aux signaux de différenciation et d'assurer ainsi leur autorenouvellement avec une efficacité maximale. Dans cette hypothèse, il convient maintenant *i*) d'élucider le mécanisme qui contrôle la transition G1/S dans les cellules ES, en particulier le mécanisme régulant l'expression de la cycline E, et *ii*) de comprendre comment il est remplacé par le mécanisme dépendant de la voie Ras → MAPK → cycline D-CDK4 → RB-E2F lors de l'engagement dans la différenciation.

BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal M. L., Agarwal A., Taylor W. R. & Stark G. R., p53 controls both the G2-M and the G1 cell cycle check-points and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, 92, 8493-8497.
- Aladjem M. I., Spike B. T., Rodewald L. W., Hope T. J., Klemm M., Jaenisch R. & Wahl G. M., ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr. Biol.*, 1998, 8, 145-155.
- Bakiri L., Lallemand D., Bossy-Wetzel E. & Yaniv M., Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.*, 2000, 19, 2056-2068.
- Baldin V., Lukas J., Marcote M. J., Pagano M. & Draetta G., Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.*, 1993, 7, 812-821.
- Bartek J., Bartkova J. & Lukas J., The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell Res.*, 1997, 237, 1-6.
- Bartkova J., Lukas J. & Bartek J., Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res.*, 1997, 3, 211-220.
- Beddington R. S. & Robertson E. J., An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the mid-gestation mouse embryo. *Development*, 1989, 105, 733-737.
- Bienvenu F., Gascan H. & Coqueret O., Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 16840-16847.
- Burdon T., Chambers I., Stracey C., Niwa H. & Smith A., Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, 1999a, 165, 131-143.
- Burdon T., Stracey C., Chambers I., Nichols J. & Smith A., Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.*, 1999, 210 (1), 30-43.
- Cheng M., Sx1 V., Sherr C. J. & Roussel M. F., Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998a, 95, 1091-1096.
- Cheng A. M., Saxton T. M., Sakai R., Kulkarni S., Mbamalu G., Vogel W., Tortorice C. G., Cardiff R. D., Cross J. C., Muller W. J. & Pawson T., Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell*, 1998b, 95, 793-803.
- Dannenbergh J. H., van Rossum A., Schuijff L. & Riele H., Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev.*, 2000, 14, 3051-3064.
- Dyson N., The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*, 1998, 12, 2245-2262.
- Fukada T., Hibi M., Yamanaka Y., Takahashi-Tezuka M., Fujitani Y., Yamaguchi T., Nakajima K. & Hirano T., Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 1996, 5, 449-460.
- Geng Y., Whoriskey W., Park M. Y., Bronson R. T., Medema R. H., Li T., Weinberg R. A. & Sicinski P., Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell*, 1999, 97, 767-777.
- Hall M. & Peters G., Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.*, 1996, 68, 67-108.
- Harbour J. W. & Dean D. C., The Rb-E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.*, 2000, 14, 2393-2409.
- Harrington E. A., Bruce J. L., Harlow E. & Dyson N., pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95, 11945-11950.
- Herzinger T. & Reed S. I., Cyclin D3 is rate-limiting for the G1/S phase transition in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 14958-14961.
- Kerkhoff E. & Rapp U. R., Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol. Cell Biol.*, 1997, 17, 2576-2586.
- Lukas J., Parry D., Aagaard L., Mann D. J., Bartkova J., Strauss M., Peters G. & Bartek J., Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 1995, 375, 503-506.
- Lukas J., Herzinger T., Hansen K., Moroni M. C., Resnitzky D., Helin K., Reed S. I. & Bartek J., Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev.*, 1997, 11, 1479-1492.
- Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T. & Yokota T., STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.*, 1999, 18, 4261-4269.
- Medema R. H., Herrera R. E., Lam E. & Weinberg R. A., Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, 92, 6289-6293.
- Motokura T., Bloom T., Kim H. G., Juppner H., Ruderman J. V., Kronenberg H. M. & Arnold A., A novel cyclin encoded by a bell-linked candidate oncogene. *Nature*, 1991, 350, 512-515.
- Muise-Helmericks R. C., Grimes H. L., Bellacosa A., Malstrom S. E., Tsichlis P. N. & Rosen N., Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 29864-29872.
- Nichols J., Evans E. P. & Smith A. G., Establishment of germline-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*, 1990, 110, 1341-1348.
- Niwa H., Burdon T., Chambers I. & Smith A., Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.*, 1998, 12 (13), 2048-2060.
- Pera M. F., Reubinoff B. & Trounson A., Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.*, 2000, 113, 5-10.
- Polyak K., Kato J. Y., Solomon M. J., Sherr C. J., Massague J., Roberts J. M. & Koff A., p27Kip, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*, 1994, 8, 9-22.
- Prost S., Bellamy C. O., Clarke A. R., Wylie A. H. & Harrison D. J., p53-independent DNA repair and cell cycle arrest in embryonic stem cells. *FEBS Lett.*, 1998, 425, 499-504.
- Qu C. K. & Feng G. S., Shp-2 has a positive regulatory role in ES cell differentiation and proliferation. *Oncogene*, 1998, 17, 433-439.
- Resnitzky D. & Reed S. I., Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell Biol.*, 1995, 15, 3463-3469.
- Sage J., Mulligan G. J., Attardi L. D., Miller A., Chen S., Williams B., Theodorou E. & Jacks T., Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev.*, 2000, 14, 3037-3050.
- Savatier P., Huang S., Szekely L., Wiman K. G. & Samarut J., Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene*, 1994, 9, 809-818.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L., Rudkin B. B. & Samarut J., Withdrawal of differentiation inhibitory activity-leukemia inhibitory factor up-regulates G1-cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*, 1996, 12, 309-322.
- Sherr C. J., Cancer cell cycles. *Science*, 1996, 274, 1672-1677.

- Sherr C. J. & Roberts J. M., CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 1999, 13, 1501-1512.
- Sjin R. M., Lord K. A., Abdollahi A., Hoffman B., Liebermann D. A., Interleukin-6 and leukemia inhibitory factor induction of JunB is regulated by distinct cell type-specific cis-acting elements. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 28697-28707.
- St Croix B., Sheehan C., Rak J. W., Florenes V. A., Slingerland J. M. & Kerbel R. S., E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J. Cell Biol.*, 1998, 142, 557-571.
- Stein G. H. & Dulic V., Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1998, 3, 14-18.
- Stevens L. C., The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.*, 1970, 21 (3), 364-382.
- Takuwa N., Fukui Y. & Takuwa Y., Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 1346-1358.
- Wang T. C., Cardiff R. D., Zukerberg L., Lees E., Arnold A. & Schmidt E. V., Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*, 1994, 369, 669-671.
- Weinberg R. A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995, 81, 323-330.