

## Retinoic acid와 dibutyryl cyclic AMP가 F9 embryonic carcinoma cell 분화 중 G1 Phase 관련 분자에 미치는 영향

박귀례<sup>#</sup> · 김건홍<sup>\*</sup> · 한순영 · 이유미 · 장성재

식품의약품안전청, 국립독성연구소, \*연세대학교

(Received March 10, 1999)

### Effect of Retinoic Acid and dibutyryl cyclic AMP on G1 Phase Associated Molecules during F9 Embryonic Carcinoma Cell Differentiation

Kui Lea Park<sup>#</sup>, Kun Hong Kim<sup>\*</sup>, Soon-Young Han, You Mie Lee and Seung Jae Jang

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,  
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, KOREA,

\*Yonsei Medical School, Seoul 120-752, KOREA

**Abstract** — Retinoic acid (RA) and dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) induce the differentiation of the multipotent embryonic carcinoma cell line, F9 cells, into parietal endoderm like cell. The F9 cells are highly proliferative doubling approximately 12 hours. S Phase is predominant, lasting 10 hours and G2/M phase occupies most of the remaining cycle (2 hours) and G1 phase is nearly non-existent. In this study, we showed the effect of RA and dbcAMP on the cell cycle associated molecules (especially around G1 phase) during F9 cell differentiation. Differentiation of F9 cells was induced by the combined addition of RA ( $10^{-7}$  M) and dbcAMP (0.5 mM), and cells were harvested daily up to 4 days. Flow cytometric analysis showed the prolongation of G1 phase around 30 hours after induction. Western blot analysis revealed that the amount of cyclin D1 and cdk2 were increased at day 4. However, histone H1 kinase activity of cdk2 was decreased. These data strongly suggest that RA and dbcAMP induce the growth arrest of F9 cells at G1 phase by decreasing the activity of cdk2, although they have increased the protein contents of cyclin D1 and cdk2. The reason for the discrepancy between the H1 kinase activity and protein contents are not clear yet.

**Keywords** □ F9 cells, retinoic acid, dbcAMP, differentiation, cyclin, cyclin dependent kinase.

Retinoic acid (RA)는 생리적 농도에서 embryonic carcinoma 세포주인 F9 cell의 분화를 유도하며, 이러한 분화과정은 분화 유도후 24-48시간 경과후에 세포 표현형의 극적인 변화를 동반한다고 보고되어 있으며<sup>1,3)</sup> laminin 및 collagen과 같은 기저막 단백질<sup>1,2,4)</sup>과 plasminogen activator<sup>1,3)</sup>등의 유전자 발현이 분화 표식자로서 이용되고 있다. F9 cell은 inner cell mass

의 세포들과 유사하며 분화된 F9 cell은 배양조건에 따라 parietal endoderm과 유사한 세포 또는 visceral endoderm과 유사한 세포로 되기 때문에 RA에 의한 분화는 정상 mouse embryo에서의 발생과정과 유사하다고 보고되어 있다.<sup>5,6)</sup> F9 cell은 매우 잘 증식하는 세포로서 약 12시간 정도의 doubling time을 가지며, 세포주기중 S phase가 약 10시간 지속되고 나머지 대부분의 시간은 G2 및 M phase로 구성되어 있으며 G1 phase는 거의 존재하지 않는 것으로 보고되어 있다.<sup>7)</sup>

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-3801-788-90 (팩스) 02-3801-788

포유동물 세포의 세포주기 조절은 일련의 cyclin-cyclin dependent kinase(cdk) 복합체의 형성, cdk의 활성화 및 불활성화에 의해 조절된다. Cyclin은 세포주기 이행에서의 양성 조절자이며, cdk의 positive regulatory subunit로 알려져 있다. 최근까지 적어도 5 종류의 cyclin 즉 cyclin A, B, C, D, 및 E가 포유동물 세포에서 발견되었으며,<sup>8-12)</sup> 또한 cdc2, cdk2, cdk4, cdk5 등의 cdk가 포유동물 세포에서 보고되어 있다.<sup>13-16)</sup> Cyclin B와 cdc2 복합체는 M phase를 유도하며,<sup>17)</sup> cyclin A와 cdk2는 S phase와 G2 phase 동안에 복합체를 형성하여 S phase 조절에 관여한다고 보고되어 있으며,<sup>18-20)</sup> D type cyclin은 cdk2, 4, 5와 복합체를 형성하고, cyclin E는 cdk2와 복합체를 형성하여 G1 phase 조절에 관여하는 것으로 보고되어 있다.<sup>21-23)</sup> Retinoblastoma susceptibility 유전자의 산물인 p105RB는 세포 주기 전반에 걸쳐 존재하는 단백질로서 S 및 G2/M phase에 hyperphosphorylated 형태로 존재하며, M phase의 끝과 G1 phase 동안에 hypophosphorylated 형태로 존재한다.<sup>24-26)</sup> Hypophosphorylated 형태의 RB는 적절한 신호를 받기 전까지 G1 phase를 통과하는 세포 주기의 진행을 정지시키며, 그 후 인산화됨으로써 불활성화된다고 생각되고 있다.<sup>27)</sup> Hypophosphorylated RB 단백질은 G1 phase 동안에 특이적으로 transcription factor인 E2F와 결합하여 E2F를 불활성화시키며, S phase로 진행하면서 인산화되면 RB/E2F 복합체가 해리되어 promoter 부위에 E2F binding site를 가진 유전자인 thymidine kinase, thymidylate synthetase, dihydrofolate reductase, DNA polymerase  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, *c-myc*, *N-myc*, *c-myb* 등을 활성화시킨다고 보고되어 있다.<sup>28,29)</sup>

본 연구에서는 증식력이 매우 좋으며, G1 phase가 거의 존재하지 않는, 따라서 G1 phase 조절에 이상이 있을 것으로 생각되는 F9 cell에 RA/dbcAMP를 처리하여 분화를 유도하였을 때 세포주기의 조절에 관여하는 물질들의 양적 변화 및 활성도의 변화를 관찰하여 RA/dbcAMP가 어떠한 기전으로 세포 주기에 영향을 미치는지 규명하고자 하였다.

### 실험방법

**세포배양** - F9 세포는 10% fetal bovine serum

(FBS), 100 units/ml penicilline G, 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 포함한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에서 배양하였으며, 분화유도제로서  $10^{-7}$  M의 all-trans-RA와 0.5 mM의 dbcAMP(Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

G1/S phase에 cell cycle을 synchronization하기 위해 Griep 및 Deluca의 방법을 이용하였다.<sup>30)</sup> 70~80% confluency의 F9 cell을 10% FBS가 포함된 DMEM으로 48시간 처리한 후 0.5% FBS가 포함된 DMEM으로 72시간 배양하고 다시 10% FBS가 포함된 DMEM에서 5시간 동안 배양한 다음, 15시간 동안 2 mM thymidine이 포함된 DMEM으로 배양하였다. 15 시간 후에 PBS로 세척하고 10% FBS가 든 DMEM으로 배양하였으며, 이때 RA와 dbcAMP를 동시 처리하여 분화유도를 시작하였다.

**세포 주기 분석** - 세포 주기 분석을 위해서  $1 \times 10^5$  개 세포를 60 mm 배양 접시에 seeding하여 배양하였고, 앞에서와 같은 조건으로 synchronization하고, 분화유도한 뒤 Vindelov등<sup>31)</sup>의 방법으로 염색하고, fluorescence-activated cell sorter(FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 분석하였다. 세포의 각 시간대에서의 세포 주기 비율은 Cell Fit program과 SOBR model을 이용하여 결정하였다.

**Western blot 면역염색과 Histone H1 kinase assay** - 세포를 차가운 RIPA buffer(150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)로 lysis시켜 total cell extract를 추출하였고, 추출물은 SDS-PAGE 전기영동법을 이용하여 분리시켰다. 표적단백질의 분자량에 따라 gel의 농도는 8% 또는 12%를 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 단백질을 nitrocellulose membrane(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 transfer하고 immunostaining을 실시하였다. Transfer된 membrane은 1% bovine serum albumin이나 5% skim milk의 TBST (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 실온에서 1시간 처리하고, 일차항체는 1:1000으로 TBST에 희석하여 4°C에서 12시간 처리하였으며, 일차항체로는 cyclin D1, cdk2, cdk4 그리고 cdc2에 대한 항체를 이용하였다(Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA). Membrane을 TBST로 씻은 다음 이차항체(peroxidase-conjugated anti rabbit IgG 혹은 anti mouse IgG antibody)는 1:2000배로 희석하

여 실온에서 1시간 처리하였다. TBST로 다시 1시간 동안 씻고 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 film에 현상시켰다.

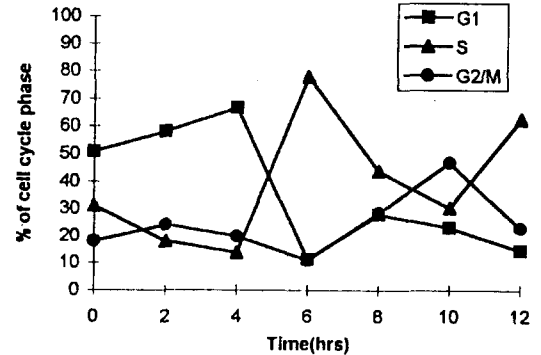
Histone H1 kinase assay는 다음과 같이 시행하였다. RIPA buffer 추출물(500 µg)에 protein A/G sepharose bead를 처리하여 비특이적 결합을 제거한 다음 cdk2 antibody를 10 µl(1 µg) 첨가하고 4°C에서 2시간 반응시킨 다음 protein A/G sepharose bead를 2시간 처리하고 원침시켰다. 침전물을 RIPA로 여러번 씻은 다음 histone H1 kinase assay buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 µg Histone H1, 50 µM ATP, 10 µCi γ-<sup>32</sup>P-ATP)를 넣고 25°C에서 30분 동안 반응시키고, 12% SDS-PAGE를 시행한 후 coomassie brilliant blue로 염색하였다. Gel dryer에서 gel을 말린 다음 film에 적당 시간 노출시킨 후 현상하였다.

**면역 형광 염색** - 면역염색을 위해 gelatin이 coating된 cover slip에 세포를 키운 다음 4% paraformaldehyde 고정액으로 실온에서 30분간 고정하였다. 0.02 M PBS로 15분간 세척한 다음, 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 처리하고 다시 PBS로 15분간 세척하였다. 일차 항체로 mouse anti-RB Ab를 0.3% Triton X-100이 든 PBS에 각각 1:1000으로 희석하여 4°C에서 12시간 처리하고 PBS로 15분씩 3번 세척하였다. 이차 항체는 fluorescence isothiocyanate(FITC)가 conjugation된 anti mouse IgG를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응하였다. PBS로 세척한 후 PBS/glycerol (1:1) 혼합액을 이용하여 slide에 부착시키고 Axiophot 형광현미경으로 관찰하였다.

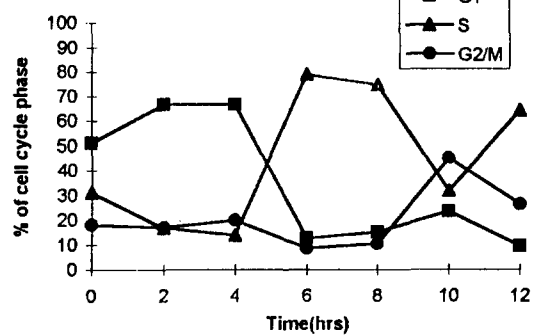
**결 과**

**Retinoic acid와 dbcAMP가 F9 cell의 성장주기에 미치는 영향** - Synchronization시킨 세포에 retinoic

**F9 Stem cell**



**F9+RA/dbcAMP**



**Fig. 1** - F9 cells were synchronized at G1/S boundary by serum starvation and high thymidine (2 mM) block. After release, RA/dbcAMP were added to the medium, and samples were taken at the indicated times. Cell cycles were monitored by flow cytometric analysis after staining of nuclear DNA with propium iodide.

acid와 dbcAMP를 동시 처리한 군과 처리하지 않은 군의 12시간까지의 세포주기를 분석하여 본 결과 12시간까지는 두 군간의 세포 주기에 차이가 관찰되지 않았으며(Fig. 1), 약 33시간 후 즉 분화 유도후 2회의 세포주기가 경과한 후부터 분화 유도한 군의 세포주기가 느려지는 것을 관찰하였고, 72시간까지 세포주기의 각 phase의 비율을 확인한 결과 G1 phase가 점점 증가하는 경향을 보였다(Table I).

**Table I** - Cell cycle phase analysis using flow cytometry

Time <sup>a</sup> (hrs)	19	21	23	35	37	39	41	59	61	63	65
G1 <sup>b</sup> (%)	28.2	24.9	19.0	31.1	34.7	32.7	31.5	44.2	45.4	44.4	46.9
S (%)	44.5	52.6	59.5	51.7	51.4	54.4	52.8	45.3	44.1	45.3	43.6
G2/M (%)	27.3	22.5	21.5	17.2	13.8	12.9	15.6	10.5	10.4	10.3	9.5

<sup>a</sup> Indicated times represent the time after addition of RA/dbcAMP.

<sup>b</sup> The percentage of cells in each phase of the cell cycle was calculated from a sample of 10,000 cells using the program Cell Fit (Model SOBR).

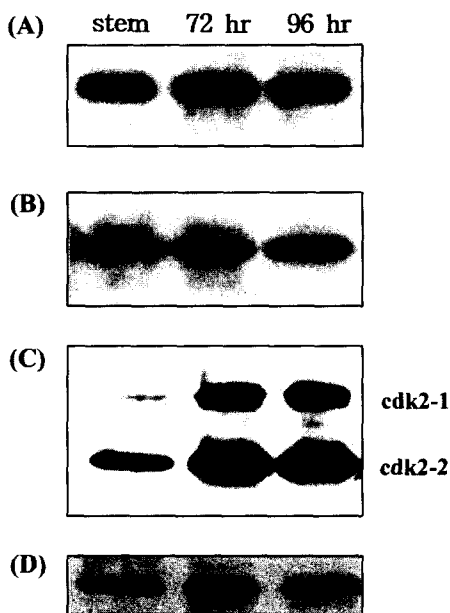


Fig. 2 - Immunoblot analysis of cell cycle associated molecules. (A) cdc2, (B) cdk4, (C) cdk2, and (D) cyclin D1.



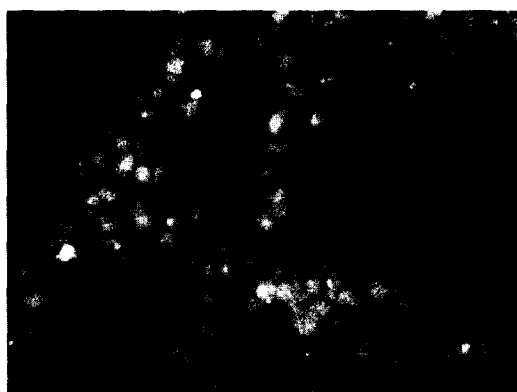
stem 72 hr 96 hr

Fig. 3 - Histone H1 kinase assay was done on anti-cdk2 immune complexes prepared from extracts at each time point.

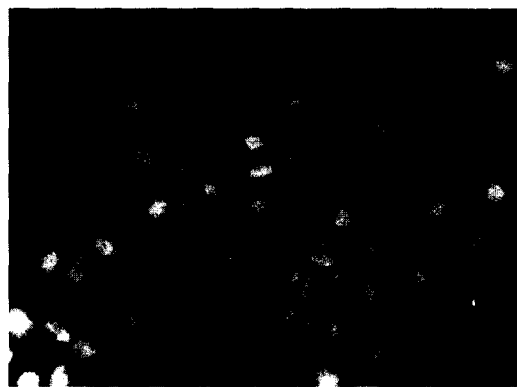
**G1 phase 세포주기 관련 분자에 대한 Western blot 면역 염색** - Synchronization하지 않은 F9 cell의 분화를 유도한 후 72시간 및 96시간대의 세포와 stem 세포로부터 단백질을 추출하여 western blot을 시행한 결과 cdc2 및 cdk4의 양은 stem 세포와 비교하였을 때 양의 변화를 관찰할 수 없었으나(Fig. 2A, B), cyclin D1 및 cdk-2는 분화가 일어나면서 그 양이 증가하였다(Fig. 2C, D).

**Histone H1 kinase 분석** - Cdk2에 대한 항체를 이용하여 histone H1 kinase assay를 시행한 결과 stem 세포에서의 histone H1 kinase activity에 비해 분화된 세포의 kinase activity가 감소하였다(Fig. 3).

**RB 단백질에 대한 면역 형광 염색** - Stem 세포와 RA/dbcAMP로 분화유도한 세포에서의 RB 단백질의



(A)



(B)

Fig. 4 - Immunohistochemical staining of p105RB with mouse anti-RB monoclonal antibody. (A) F9 stem cell, (B) differentiated F9 cell.

양적 변화 유무를 알아보기 위하여 시행한 면역 조직화학 염색결과 RB 단백질의 핵내 표현은 두 군간에 별다른 차이가 없었다(Fig. 4).

### 고찰

Griep 등<sup>30)</sup>은 G1/S phase 이행부위에 부분적으로 synchronization시킨 F9세포에 RA를 처리하면 S phase 전반부에 DNA 복제 양상의 변화가 일어난다고 보고하였고, 다음 세포주기 동안에 형태 및 생화학적으로 분명한 분화가 유도되지만, S phase 후반부에 RA를 처리하면 다음 세포주기 때 분화의 양상을 관찰할 수 없으므로 RA에 의한 F9세포 분화에 있어 RA는 DNA의 초기 복제기간 동안에 작용하여 그 효과를 나타낼 것이라고 보고하였다. 본 실험에서는 DNA 복제의 양상을 확인하지는 않았지만 flow cytometry를 이

용하여 stem세포와 RA/dbcAMP를 처리한 세포의 세포 주기를 비교하였으며, 12시간까지는 두군에서의 차이를 발견할 수 없었고, 시간을 늘려서 배양하여 각 군을 비교해본 결과 두 군에서의 세포주기의 차이가 나타나는 시기는 RA/dbcAMP 처리 후 두번의 세포주기가 지난 시기(약 33시간 후)에서 부터 차이를 나타내는 것으로 생각되었다. 또한 Rosenstraus 등<sup>32)</sup>은 분화된 세포에서 S phase가 세포주기의 74%, G1 phase가 14%, G2 phase가 12%를 차지하는 것으로 보고하였으나, 본 실험의 결과 형태학적으로 분화가 이루어진 시기인 60시간 이후로 S phase의 세포는 약 45%, G1 phase의 세포도 약 45%를 차지하였고 분화가 진행될수록 G1 phase의 분획은 증가하는 양상을 보였다.

Western blot immunostaining 및 histone H1 kinase assay를 시행한 결과 cdc2, cdk4의 경우 RA/dbcAMP로 분화 유도된 세포군과 stem 세포 사이에서 양적 변화는 관찰되지 않았으며, cyclin D1은 분화유도시 약간의 양적증가의 변화가 있었고(Fig. 2), cdk2의 경우에는 RA/dbcAMP로 분화 유도된 세포군에서 cdk2의 두 형태 즉 빨리 이동하는 활성형(cdk2-2) 과 느리게 이동하는 불활성형(cdk2-1)<sup>34)</sup> 모두가 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2). 전기영동상에서 관찰되는 cdk2의 두 형태는 인산화의 질적 및 양적 상태의 차이에 의해 나타나는 것으로 빨리 이동하는 cdk2-2만이 phosphotyrosine을 가지고 있고, cdk2-2는 cdk2-1의 인산화 유도체라고 보고되어 있으며, cyclin E와 활성형의 복합체를 형성하며, 따라서 cdk2의 kinase 활성은 인산화 및 cyclin E의 축적정도, cyclin E 자체의 인산화에 의해서 조절된다고 보고되어 있다.<sup>33)</sup> Cdk2 면역 침전물의 histone H1 kinase assay를 시행한 결과 stem 세포의 kinase 활성에 비해 분화된 세포의 활성이 급격히 감소한 것을 확인하였다. Cdk2는 G1 cyclin인 cyclin D 및 E와 복합체를 형성하고 활성화되면 G1 phase의 중반기 이후에 세포내 p105RB를 인산화시키는 것으로 보고되어 있다.<sup>34)</sup> 따라서 본 실험의 결과인 cdk2의 활성의 감소는 p105RB의 인산화의 감소를 동반하여 세포가 S phase로 진행되는 것을 저해할 것으로 생각되며, 이는 flow cytometry 분석에서 분화가 일어날 때 G1 phase의 분획이 증가하는 결과와 일치한다. Cdk2 양의 증가와 활성도 감소와의 상관 관계에 대해서는 아직 정확히 알 수 없으나, Dulic 등<sup>35)</sup>은 노화된 human diploid fibroblast를 대상으로 실험한 결

과 노화 세포에서는 G1 cyclin인 cyclin D1과 cyclin E의 양이 10~15배 증가하였으나, cyclin E와 연관된 kinase 활성은 감소하였으며, 노화 세포에 존재하는 cyclin E는 주로 underphosphorylated 형태였고 불활성형의 cdk2를 가지고 있어 p105RB를 인산화하지 못하기 때문에 mitogenic stimulation을 가하여도 세포가 S phase로 들어가지 못하였음을 보고하였다. 그러나 분화된 F9 세포에서의 cdk2는 노화세포와는 다르게 불활성형의 cdk2-1 뿐만아니라 인산화된 활성형의 cdk2-2도 증가하였으므로 cdk2의 histone H1 kinase 활성의 감소는 cdk2와 결합하는 G1 cyclin의 인산화 현상에 기인하는 것으로 사료되었다.

따라서 RA/dbcAMP는 F9 세포의 G1 phase cyclin에 영향을 직접적으로 미치거나, G1 phase cyclin을 인산화하는 효소 또는 탈인산화하는 효소의 발현 및 활성의 변화를 유도하여 세포의 분화를 유도할 수 있을 것으로 사료되며, 차후의 연구에서는 이러한 가능성에 대한 기초 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결 론

RA와 dbcAMP를 동시 처리하여 F9 세포를 parietal endoderm like 세포로 분화시켰을 때 세포주기의 변화, 세포주기 관련 물질들의 양적 변화 및 활성도의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. F9 세포가 분화되었을 때 세포주기 관련 물질의 양적 변화를 western blot immunostaining 방법 및 immuno-histochemical staining 방법으로 확인한 결과 cdc2, cdk4 및 p105RB는 stem 세포와 비교하였을 때 변화가 없었고, cyclin D1은 약간 증가한 양상을 보였으며, cdk2는 활성형, 비활성형 모두 증가하였다.

2. Cdk2의 histone H1 kinase 활성을 확인한 결과 stem 세포에 비해 분화된 세포의 kinase 활성이 현저히 감소되었다.

3. 이상의 결과를 종합하면 RA와 dbcAMP는 F9 세포의 분화유도에 있어 G1 phase와 연관된 cyclin의 활성을 변화시킴으로써 그 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) Strickland, S. and Mahadavi, V.: The induction of

- differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*. **15**, 393 (1978).
- 2) Jetten, A. M., Jetten, M. E. R. and Sherman, M. I. : Stimulation of differentiation of several murine embryonal carcinoma cell lines by retinoic acid. *Exp. Cell Res.* **124**, 38 (1979).
  - 3) Strickland, S., Smith, K. K. and Marotti, K. R. : Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP. *Cell*. **21**, 347 (1980).
  - 4) Adamson, E. D., Gaunt, S. J. and Graham, C. F. : The differentiation of teratocarcinoma stem cells is marked by the types of collagen which are synthesized. *Cell*. **124**, 381 (1979).
  - 5) Martin, G. : Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. **209**, 768 (1980).
  - 6) Hogan, B. L. M., Taylor, A. and Adamson, E. : Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. *Nature*. **291**, 235 (1981).
  - 7) Rosenstrauss, M. J., Sundell, C. L. and Liskay, R. M. : Cell cycle characteristics of undifferentiated and differentiated embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.* **89**, 516 (1982).
  - 8) Pines, J. and Hunter, T. : Human cyclin A is adenovirus E1A associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*. **346**, 760 (1990).
  - 9) Lew, D. J., Dulic, V. and Reed, S. I. : Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell*. **66**, 1197 (1991).
  - 10) Matsushima, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. : Colony stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. **65**, 701 (1991).
  - 11) Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Juppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. and Arnold, A. : A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*. **350**, 512 (1991).
  - 12) Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B. and Beach, D. : Human D type cyclin. *Cell*. **65**, 691 (1991).
  - 13) Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C., Su, L., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E. and Tsai, L. : A family of human cdc-2 related protein kinases. *EMBO J.* **11**, 2909 (1992).
  - 14) Pines, J. : Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 195 (1993).
  - 15) Pines, J. and Hunter, T. : Cyclin dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends Cell Biol.* **1**, 117 (1991).
  - 16) Sherr, C. J. : Mammalian, G1 cyclins. *Cell*. **73**, 1059 (1993).
  - 17) Norbury, C. and Nurse, P. : Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 441 (1992).
  - 18) Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. and Lamb, N. : Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblast. *Cell*. **67**, 1169 (1991).
  - 19) Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G. : Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**, 961 (1992).
  - 20) Zindy, F., Lamas, E., Chenivesse, X., Sobczack, J., Wang, J., Fesquet, D., Henglein, B. and Brechot, C. : Cyclin A is required in normal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1144 (1992).
  - 21) Baldin, V., Likas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., Bartek, J. and Draetta, G. : Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* **7**, 812 (1993).
  - 22) Ohtsubo, M. and Roberts, J. M. : Cyclin dependent regulation of G1 in mammalian cells. *Science*. **259**, 1908 (1993).
  - 23) Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. : Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* **7**, 1559 (1993).
  - 24) Buchkovich, K., Duffy, L. A. and Harlow, E. : The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*. **58**, 1097 (1989).
  - 25) Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y. and Lee, W. H. : Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*. **58**, 1193 (1989).
  - 26) Mihara, K., Cao, X. R., Yen, A., Chandler, S., Driscoll, B., Murphree, A. L., Tang, A. and Fung, Y. K. : Cell cycle dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science*. **246**, 1300 (1989).
  - 27) Savatier, P., Huang, S., Szekely, L., Wiman, K. G. and

- Samarut, J. : Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene*, **9**, 809 (1994).
- 28) Hiebert, S. W., Blake, M., Azizkhan, J. and Nevins, J. R. : Role of E2F transcription factor in E1A mediated transactivation of cellular genes. *J. Virol.* **65**, 3547 (1991).
- 29) Hamel, P. A., Gill, R. M., Phillips, R. A. and Gallie, B. L. : Transcriptional repression of the E2 containing promoters E1aE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3431 (1992).
- 30) Griep, A. E. and Deluca, H. F. : Studies on the relation of DNA synthesis to retinoic acid induced differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **164**, 223 (1986).
- 31) Vindelov, L. L., Christensen, I. B. J. and Nissen, N. I. : A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, **3**, 323 (1983).
- 32) Rosenstraus, M. J., Sundel, C. L. and Liskay, R. M. : *Dev. Biol.* **89**, 516 (1982).
- 33) Dulic, V., Lees, E. and Reed, S. I. : Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, **257**, 1958 (1992).
- 34) Hinds, P. W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Redd, S. I. and Weinberg, R. A. : Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, **70**, 993 (1992).
- 35) Dulic, V., Drullinger, L. F., Lees, E., Reed, S. I. and Stein, G. H. : Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: Accumulation of inactive cyclin E-cdk2 and cyclin D1-cdk2 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11034 (1993).