

文章编号: 1004-0374(2009)05-0626-05

## 胚胎干细胞周期调控的研究进展

蒋斯博, 陈柳, 李凌松\*

(北京大学干细胞研究中心, 国家级国际联合研究中心, 北京 100191)

**摘要:** 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有自我复制和多潜能分化的特性。相对于体细胞, 胚胎干细胞的细胞周期调控非常特别。比如,  $G_1$  期较短; p53、RB 等调控细胞周期“检验点”的蛋白分子功能“异常”等。胚胎干细胞细胞周期调控的研究对于研究胚胎干细胞的自我复制和多潜能性, 都具有重要指导意义。该文将重点比较体细胞和胚胎干细胞在细胞周期调控方面的差异, 并对近年来有关小鼠和人胚胎干细胞的细胞周期调控的研究进展进行介绍。

**关键词:** 胚胎干细胞; 细胞周期; p53; microRNA

**中图分类号:** Q253; Q813 **文献标识码:** A

## The progress on regulation of cell cycle in embryonic stem cells

JIANG Si-bo, CHEN Liu, LI Ling-song\*

(Stem Cell Research Center, National Center for International Research, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Embryonic stem cells (ESCs) can self-renew and differentiate into all kinds of cells from different germ layers. In addition, ESCs differ from somatic cells in the cell-cycle regulation. For instance, ESCs have short  $G_1$  phase, they do not have such check-points as p53 and RB. Understanding cell cycle regulation in ESCs will provide insight into the underlying mechanism regarding the regulation of ESC self-renewal and pluripotency. This review will emphasize on the difference in cell cycle regulation in somatic cells versus ESCs, and update our understandings for regulation of cell cycle in mouse and human ESCs.

**Key words:** embryonic stem cell; cell cycle; p53; microRNA

1981年 Evens 和 Kaufman<sup>[1]</sup>, 以及 Martin<sup>[2]</sup> 成功建立了第一株小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs); 1998年, Thomson 等<sup>[3]</sup> 建立第一株人胚胎干细胞系; 到2006年, Takahashi 和 Yamanaka<sup>[4]</sup> 又建立人诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。二十多年来, 胚胎干细胞的研究取得了许多突破性进展。然而, 胚胎干细胞细胞周期调控的研究还十分有限, 深入了解胚胎干细胞的细胞周期调控, 对胚胎干细胞尽快走向临床应用, 具有重要指导意义。本文将系统比较体细胞和胚胎干细胞在细胞周期调控方面的差别, 着重介绍胚胎干细胞独特的细胞周期特点, 以及近年来在胚胎干细胞周期调控研究方面所取得的进展。

### 1 体细胞的细胞周期调控

细胞周期是指细胞从前一次分裂结束起到下一

次分裂结束为止的活动过程, 可人为地划分为  $G_0$  期、 $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期和 M 期五个阶段。不同细胞的细胞周期差别很大, 这种差别主要是由于  $G_1$  期长短不同, 而 S、 $G_2$ 、M 期相对恒定。 $G_1$  期到 S 期的转换是细胞周期调控的中心事件并且是个极其复杂的过程。

不同细胞周期的转换主要是由周期特异的“检验点(check point)”来控制, 并受到由 p53 和 RB 等蛋白分子的监督调控。比如, 细胞进入  $G_1$  期时有

收稿日期: 2009-08-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA02A114; 2007DFC31650863); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2006CB943603; 2006CB503905); 北京市科委基金(D07050701350704)

\*通讯作者: E-mail: Lingsongli@bjmu.edu.cn

两个重要检验点, R点(restriction point)和S点(S point), 当细胞进入R点时, 标志着细胞周期开始运转; 而当细胞通过S点, 意味着G<sub>1</sub>期的完成和S期的开始<sup>[5]</sup>。这两个检验点有时统称为G<sub>1</sub>/S检验点(G<sub>1</sub>/S checkpoint)。此外, 在S期有DNA复制检验点(DNA replication checkpoint); G<sub>2</sub>期有解连环检验点(decatenation checkpoint)<sup>[6]</sup>和G<sub>2</sub>/M检验点(G<sub>2</sub>/M checkpoint); M期有纺锤体组装检验点(spindle assembly checkpoint); 而DNA损伤检验点(DNA damage checkpoint)在G<sub>1</sub>、S和G<sub>2</sub>期都是存在的<sup>[7]</sup>。

细胞周期调控依赖于不同信号分子的系统的网络调控。其中重要的环节之一是细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的活性状态。CDKs包括Cdk1、Cdk2、Cdk4和Cdk6等, 它们通过“磷酸化-去磷酸化”激活或抑制下游信号分子, 从而促进细胞周期的运转; 而CDKs的功能又受到来自细胞周期蛋白(cyclin)的正调节和来自细胞周期抑制蛋白(cell cycle inhibitory protein, CKI)的负调节。周期蛋白包括cyclin A1、A2、B1、B2、D1、D2和D3等。其中, cyclin D是G<sub>1</sub>期最早合成的周期蛋白。在细胞外激活信号作用下, cyclin D持续表达, 从而启动细胞周期, 促进细胞周期G<sub>1</sub>/S转换。而细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CDIs)是通过与CDKs或者CDK-cyclin复合物结合而发挥抑制功能的一类蛋白。现已发现的CDIs有两个家族: INK4家族和Cip/Kip家族。INK4家族包括p15<sup>INK4b</sup>、p16<sup>INK4a</sup>、p18<sup>INK4c</sup>和p19<sup>INK4d</sup>; Cip/Kip家族包括p21<sup>cip1</sup>、p27<sup>kip1</sup>和p57<sup>kip</sup>。

G<sub>1</sub>/S转换是细胞周期运转的关键和限速步骤。目前已知在体细胞中有两条重要的信号通路调控G<sub>1</sub>/S转换<sup>[8]</sup>: (1) Ras/ERK、cyclin D、Rb-E2F通路。细胞外激活信号通过G蛋白偶联受体激活Ras-Raf-MEK-Erk通路, 然后激活cyclin D的转录, cyclin D与Cdk4和Cdk6形成复合物, 催化RB磷酸化使之释放转录因子E2F, E2F再激活大量下游分子的转录, 其中包括cyclin E和cdc25A (cell division cycle 25A, 细胞分裂周期蛋白25A)。cyclin E和Cdk2结合后又可激活自身其他靶蛋白, 并且磷酸化RB, 形成正反馈, 最终导致细胞进入S期。在这个过程中, cyclin D的水平决定了细胞周期运转的开始, cyclin E的水平决定细胞进入S期。(2) c-myc是细胞周期调控的另一重要分子, 其中c-myc通路至今还没有完全研究清楚。经典理论认为c-myc可以直接

激活cyclin E和cdc25A的表达, 并且抑制p15、p16等CDIs的作用<sup>[9]</sup>。cdc25A的主要作用是使cyclin/CDK去磷酸化而恢复活性<sup>[10]</sup>。另外, 最新研究表明, c-myc可以促进miR-17和miR-20a表达从而调节E2F1活性<sup>[11]</sup>; c-myc还能够限制ATM和ATR的激活, 并且促进核苷酸的生物合成。可见, c-myc对于细胞进入S期有着广泛的调节作用<sup>[12]</sup>。

## 2 胚胎干细胞的细胞周期特点和可能的分子机制

胚胎干细胞是一群来源于囊胚内细胞团, 具有自我复制和多功能潜能的细胞。一定条件下, 可以在体外长期培养, 并保持多潜能分化的能力。由于具有较短的细胞周期, 从而能快速增殖。这种特殊细胞周期主要是由于G<sub>1</sub>期的缩短。在合适的培养条件下, 小鼠胚胎干细胞的一个细胞周期为11 h, G<sub>1</sub>期只有2 h<sup>[13, 14]</sup>; 人胚胎干细胞的细胞周期是15-16 h, G<sub>1</sub>期只有2.5-3 h<sup>[15]</sup>。尽管这两种ESCs周期特点类似, 但是培养条件不尽相同: 小鼠胚胎干细胞培养不需要添加生长因子, 但是需要Lif或滋养层细胞; 人胚胎干细胞培养需要添加bFGF, 不需要Lif<sup>[16]</sup>。胚胎干细胞这种细胞周期特点必然与其独特细胞周期调控有直接的关系。

### 2.1 小鼠胚胎干细胞细胞周期调控的分子机制

小鼠胚胎干细胞的细胞周期调控研究存在很多争议。Savatier等<sup>[17]</sup>最先在1995年报道, 在转录水平发现cyclin D1弱表达, cyclin D2、D3不表达, Cdk4/cyclin D激酶的活性未能检测到, 因此推测cyclin D在小鼠ES细胞G<sub>1</sub>/S转换不起作用。这个结果后来一直被广泛认可, 直到2004年, Faast等<sup>[18]</sup>在蛋白水平发现小鼠胚胎干细胞cyclin D1、D3表达中等, cyclin D2则未检测到。2005年, Fujii-Yamamoto等<sup>[19]</sup>的研究则认为cyclin D1、D2表达很弱, Cyclin D3表达较高。免疫共沉淀进一步显示, 小鼠胚胎干细胞中存在Cdk6/cyclin D1和Cdk6/cyclin D3的复合物, 但是Cdk6/cyclin D1表达更弱。另外, 低水平的Cdk4/cyclin D1和Cdk4/cyclin D3也能检测到。而且, 用分离的Cdk6/cyclin D复合物以RB为底物进行体外活性分析, Cdk6/cyclin D1和Cdk6/cyclin D3都显示出较强的激酶活性, 但是只有Cdk6/cyclin D3的活性不受p16<sup>INK4a</sup>影响<sup>[18]</sup>。Cyclin D在小鼠胚胎干细胞细胞周期中的调控作用还不很清楚。值得注意的是cyclin D基因敲除(cyclin D1<sup>-/-</sup>D2<sup>-/-</sup>D3<sup>-/-</sup>)小鼠能够发育到E17.5 d, 最后死于心血管系统障碍<sup>[20]</sup>。提示在小鼠胚胎干细胞中, cyclin D可能不是调控G<sub>1</sub>/S转换的惟一分子。

cyclin D、Cdk2/cyclin E 和 Cdk2/cyclin A 在小鼠胚胎干细胞的整个细胞周期中都有较高的活性，而 cyclin E 的抑制因子 p21<sup>cip1</sup>、p27<sup>kip1</sup> 则低表达。由于 cyclin D 在小鼠胚胎干细胞中的周期调控作用还存在争议，cyclin E 被认为在细胞 G<sub>1</sub>/S 转换过程中起主要作用。而在 G<sub>2</sub>/M 期的转换中，一般认为 Cdk1/cyclin B (Ccd2/cyclin B) 和 Cdk2/cyclin A 是其作用分子。但是，小鼠胚胎干细胞周期蛋白激酶中，只有 Cdk1/cyclin B 具有周期依赖性。此外，如果 Cdk2 受到抑制之后，细胞周期则会明显延长，但是周期结构并没有改变，显示 Cdk2 对周期进展的各个时相均有作用<sup>[21]</sup>。cyclin A 的作用过去研究较少，Kalaszczynska 等<sup>[22]</sup>最近报道 cyclin A 在小鼠胚胎干细胞细胞周期运转不可缺少，但是其分子机制仍然不清楚。

通过与小鼠胚胎成纤维细胞比较，Fuji-Yamamoto 等<sup>[19]</sup>发现很多小鼠胚胎干细胞的细胞周期正调控因子 mRNA 水平表达都较高，包括 Cdk1、Cdk2、PCNA 和 cyclin A2 等，而且这与基因启动子 histone H3 的乙酰化呈正相关。另外，尽管众多调控分子具有较高的 mRNA 水平，但是只有 ASK、cdc6、cyclin A2 和 cyclin B1 的蛋白水平很高，这些现象都提示胚胎干细胞细胞周期调控的复杂性。

小鼠胚胎干细胞也表达 RB 蛋白家族(包括 RB1/p105、RB2/p130、RB3/p107)<sup>[22]</sup> 和 E2F 蛋白家族，其中，E2F4 是 E2F 家族的主要表达蛋白。目前对于 RB2/p130 的作用研究还很少，但是发现 RB1/p105、RB3/p107 在小鼠胚胎干细胞的各个时相中一直是高度磷酸化和失活的。由于 RB 的失活，不能与 E2F 形成复合物，从而使 E2F 一直处于激活状态并进而导致下游大量靶基因的激活。而且，E2F 依赖的转录激活也是非细胞周期依赖性的<sup>[21]</sup>。E2F 的持续激活解释了小鼠胚胎干细胞培养不需要生长因子的特性。在体细胞中，生长因子主要是通过 Ras/ERK-cyclin D-E2F 通路发生作用，但是在小鼠胚胎干细胞中，RB 的失活和 E2F 的激活导致了这条通路不需要生长因子就能持续激活，并最终使得细胞迅速增殖。

此外，较早的研究提示了小鼠胚胎干细胞的 G<sub>1</sub>/S 检验点的不同特点。经过伽玛射线照射诱导 DAN 损伤之后，大部分细胞不会停滞在 G<sub>1</sub> 期，而是直接走向了凋亡。这个过程中 chk2 分子有重要作用，上调 chk2 后会使得更多的细胞停留在 G<sub>1</sub>/S 检验点<sup>[24]</sup>。

小鼠胚胎干细胞 G<sub>2</sub> 期的解连环检验点同样不同寻常。在成体分化细胞中，细胞只有染色体被拓扑异构酶 II 解接连环，细胞才能进入 M 期，但是胚胎干细胞接连环还未完成，就可以直接进行有丝分裂，这样大大增加子代细胞多倍体的概率<sup>[25]</sup>。

有研究表明，小鼠胚胎干细胞 M 期的纺锤体组装检验点也和体细胞的 M 期不同。当用 Nocodazole 等药物阻断微管组装时，细胞并不会走向凋亡，反而会形成多倍体并可以重新进入新的有丝分裂周期。而且，这种多倍体细胞可以在一段时间内存在并正常的有丝分裂，直至最终形成一个相对均一的近二倍体的非整倍体细胞群。这个发现的重要意义还在于，以前很多细胞周期的研究都是依赖于有丝分裂阻断剂型(如秋水仙碱)，由于纺锤体组装检验点的异常有可能导致受到处理的细胞群体出现多倍体细胞或假分裂细胞，这必然影响人们对实验结果的解释。在这个过程中，虽然 p53 在小鼠胚胎干细胞高表达，但是并没有发挥通常在体细胞细胞周期中的调控作用<sup>[26]</sup>。因此，人们对于小鼠胚胎干细胞的细胞周期调控认识还相当粗浅。

**2.2 人胚胎干细胞的细胞周期调控分子机制** 相对与小鼠胚胎干细胞的研究，人胚胎干细胞的周期调控研究较晚。最近研究认为 Cdk2、Cdk4、cyclin D1、cyclin D2、cyclin D3、cyclin E、cdc25A 和 c-myc 在人胚胎干细胞均有表达。免疫共沉淀的研究显示 Cdk6/cyclin D1、Cdk6/cyclin D3、Cdk4/cyclin D1、Cdk4/cyclin D3、Cdk2/cyclin E、Cdk2/cdc25A 和 Cdk2/c-myc 复合物的存在。RB1/p105 磷酸化和非磷酸化的形式也都有。此外，由于泛素化蛋白降解途径的增强，在一定程度上导致了 CDIs (p15、p16、p19、p18、p21、p27) 表达降低，甚至缺失<sup>[8,27]</sup>。例如，skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) 是 SCF 型泛素连接酶的亚基之一，由于它在细胞的 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 期表达均很高，从而使得 p27 的表达处于很低的水平<sup>[28]</sup>。

与小鼠胚胎干细胞不同的是，人胚胎干细胞中很多周期调控蛋白都具有明显的周期依赖性，例如 Cdk2 在 S 期、cyclin A 和 c-myc 在 S 期和 G<sub>2</sub> 期、cyclin B1 在 G<sub>2</sub> 期、cyclin E 在 G<sub>1</sub> 和 S 期，cdc25A 在 G<sub>1</sub> 期高表达<sup>[8]</sup>。

研究证明，Cdk2、Cdc25A、Cdk6 在 G<sub>1</sub>/S 转换中有重要作用。例如，Cdk2 下调会导致 G<sub>1</sub> 期细胞的积累；cdc25A 下调会导致细胞 S 期进展障碍；Cdk6 和 cdc25A 的上调都会导致细胞尽快的进入 S 期<sup>[28]</sup>。

RB/E2F 复合体及其调控的分子机制在人胚胎干细胞研究得还不是很清楚, 最近在转录水平的研究发现RB1/p105 应答的E2F 家族各个成员表达不一样, E2F1、E2F2 和E2F3 表达较弱, 只占到E2F 家族总活力的20%左右。相对与成体细胞, E2F 可能更多的受到抑制。另外, RB2/p130 及其下游调控分子E2F5 是RB 和E2F 家族在人ES 细胞表达最丰富的成员。这些证据提示相对于人的体细胞, 人胚胎干细胞在通过R点时可能更少地依赖RB/E2F 通路<sup>[5]</sup>。

Becker 等<sup>[5]</sup>的研究提示S 点在细胞周期调控中可能有一定作用。当细胞通过S 点时, HiNF-P、p220NPAT 及其下游分子histone H4 表达会显著上调, 从而使细胞进入S 期, 并且这个过程是与DNA 的复制紧密偶联的。而在成体分化细胞, HiNF-P 和p220NPAT 表达并没有周期依赖性。另外, 与小鼠胚胎干细胞类似, 人胚胎干细胞的纺锤体组装检验点也存在特点, 当细胞分裂失败时, 人胚胎干细胞同样会形成多倍体细胞而不是走向凋亡。

目前, 人胚胎干细胞DNA 损伤检验点的作用还存在一定争议。Becker 等<sup>[5]</sup>报道射线照射诱导DNA 损伤后, 会导致p53 依赖的p21 激活, 进而导致细胞周期停滞。同时, HiNF-P、p220<sup>NPAT</sup>、histone H4、E2F 家族和RB 等基因的表达也发生显著改变。而Qin 等<sup>[29]</sup>报道, DNA 损伤后会引起p53 的上调并进而引起人ES 细胞凋亡, 但是p53 并不会直接激活下游靶基因的转录, 而是通过线粒体途径来发挥作用。

**2.3 胚胎干细胞全能性关键分子在细胞周期中的作用** Oct4、Sox2 和Nanog 是维持胚胎干细胞全能性的关键作用分子。同时, Oct4、Sox2、Klf4 和c-Myc 也是最初用于建立IPSCs 的四个因子<sup>[4]</sup>。有人用Chip-on-Chip的方法, 发现内源性的这四个转录因子在小鼠胚胎干细胞的全基因组上有5 000多个基因启动子结合位点, 其中c-Myc、Klf4、Oct4 和Sox2 参与细胞周期过程的靶基因数目分别是273、102、68 和56, 提示这四个因子对于ES 细胞周期可能具有一定的调控作用<sup>[30]</sup>。

通过大规模基因芯片结果分析提示在小鼠胚胎干细胞中, Oct4 与细胞周期有密切关系。38 个细胞周期相关基因与Oct4 的表达呈正相关, 这些基因包括cdc5A、cyclin B1 和cyclin F 等。其中, Oct4 对cyclin F 的调控已经被实验进一步证实<sup>[31]</sup>。此外, Oct4/Sox2 还通过microRNA 途径参与了细胞周期的调控。

最近的研究揭示了Nanog 在细胞周期中也具有重要作用。在人胚胎干细胞, Nanog 调控了Cdk6 和cdc25A 的表达, 通过该通路, 上调Nanog 能够显著促进人胚胎干细胞的G<sub>1</sub>/S 转换<sup>[32]</sup>。

**2.4 microRNA 在胚胎干细胞细胞周期中的作用** microRNA (miRNA) 是在细胞生命活动中起着重要调节作用的一群18 - 25 核苷酸的非编码小RNA。它们通过结合靶mRNA 分子来诱导降解或抑制翻译。miRNA 在胚胎干细胞周期调控中的作用最初是通过分析敲除miRNA 合成过程中的关键分子Dgcr8 或Dicer 的胚胎干细胞模型得到证实的。敲除这两个基因的小鼠胚胎干细胞增殖缓慢, 较多细胞都停留在G<sub>1</sub> 期, 接下来人们证实向细胞导入miR-290、miR-320以及miR-17/20/106家族成员能够拯救增殖缺陷的胚胎干细胞。而且, 这些miRNA 在野生ES 细胞大量表达, 由此提示miRNA 在促进了胚胎干细胞的G<sub>1</sub>/S 期转换中起到重要作用。进一步的研究发现, miRNA 主要通过抑制Cdk2-cyclin E 通路抑制因子来调节细胞周期, 其中, p21、RBL2 和Lsts2 是已被证实miRNA 直接作用靶点<sup>[33, 34]</sup>。

另外, Oct4/Sox2 对胚胎干细胞G<sub>1</sub>/S 期的转换的调节可能通过对miR-302 转录调控来实现。而miR-302 可以在翻译水平抑制cyclin D1 的表达, 从而调节胚胎干细胞的细胞周期。此外, RB、E2F1、P130、Cdk2 和Cdk6 也可能是miR-302 潜在的下游靶分子<sup>[35]</sup>。

### 3 前景展望

胚胎干细胞在体外的快速增殖能力是与受精后囊胚内细胞团在体内迅速发育的特性相一致的。而且它的这种增殖特性随着细胞的分化而逐渐消失。尽管目前成体细胞细胞周期调控的机制已经研究得比较清楚, 但是胚胎干细胞的周期调控特点及其分子机制仍然有很多不清楚的地方。第一, 胚胎干细胞的增殖特性与全能性的维持之间的关系还报道很少; 第二, 小鼠和人的胚胎干细胞有不少相似之处, 但也存在众多差异, 目前仍然缺乏对这种差异的系统研究<sup>[8]</sup>; 第三, 胚胎干细胞中G<sub>1</sub>/S 转换的分子机制还不是很清楚, 比如cyclin D 的作用、RB 被高度磷酸化以及CDKs 表达很低的原因; 第四, 尽管已经公认胚胎干细胞周期中的各个检验点存在不同于体细胞的特点, 但是其具体作用几乎一无所知。此外, 近年来microRNA 在细胞周期调控中的作用日益受到重视, 但是miRNA 如何调控下游大量的靶基因以及miRNA 自身表达如何被调控仍然需要

大量的研究来证明<sup>[34]</sup>。总之，这个领域目前有着十分广阔的研究前景，随着胚胎干细胞独特周期调控机制的进一步揭示，对于胚胎干细胞的临床应用将具有重大意义。

### [参 考 文 献]

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292 (5819): 154-6
- [2] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78 (12): 7634-8
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282 (5391): 1145-7
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126 (4): 663-76
- [5] Becker KA, Stein JL, Lian JB, et al. Establishment of histone gene regulation and cell cycle checkpoint control in human embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, 2007, 210 (2): 517-26
- [6] Damelin M, Sun YE, Sodja VB, et al. Decatenation checkpoint deficiency in stem and progenitor cells. *Cancer Cell*, 2005, 8 (6): 479-84
- [7] Pollard TD, Williams C. *Cell biology [M]*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008: 731-850
- [8] Neganova I, Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J Anat*, 2008, 213 (1): 30-44
- [9] Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 1996, 382 (6591): 511-7
- [10] Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*, 2003, 4 (7): 671-7
- [11] Pickering MT, Stadler BM, Kowalik TF. miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression. *Oncogene*, 2009, 28 (1): 140-5
- [12] Herold S, Herkert B, Eilers M. Facilitating replication under stress: an oncogenic function of MYC? *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (6): 441-4
- [13] Savatier P, Huang S, Szekely L, et al. Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene*, 1994, 9 (3): 809-18
- [14] Fluckiger AC, Marcy G, Marchand M, et al. Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24 (3): 547-56
- [15] Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol*, 2006, 209 (3): 883-93
- [16] Draper JS, Moore HD, Ruban LN, et al. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2004, 13 (4): 325-36
- [17] Savatier P, Lapillonne H, van Grunsven LA, et al. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*, 1996, 12 (2): 309-22
- [18] Faast R, White J, Cartwright P, et al. Cdk6-cyclinD3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16 (INK4a). *Oncogene*, 2004, 23 (2): 491-502
- [19] Fujii-Yamamoto H, Kim JM, Arai K, et al. Cell cycle and developmental regulations of replication factors in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005, 280 (13): 12976-87
- [20] Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*, 2004, 118 (4): 477-91
- [21] Stead E, White J, Faast R, et al. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene*, 2002, 21 (54): 8320-33
- [22] Kalaszczynska I, Geng Y, Iino T, et al. Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells. *Cell*, 2009, 138 (2): 352-65
- [23] Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A. The retinoblastoma gene is involved in multiple aspects of stem cell biology. *Oncogene*, 2006, 25 (38): 5250-6
- [24] Hong Y, Stambrook PJ. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (40): 14443-8
- [25] Damelin M, Sun YE, Sodja VB, et al. Decatenation checkpoint deficiency in stem and progenitor cells. *Cancer Cell*, 2005, 8 (6): 479-84
- [26] Mantel C, Guo Y, Lee MR, et al. Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability. *Blood*, 2007, 109 (10): 4518-27
- [27] Neganova I, Zhang X, Atkinson S, et al. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene*, 2009, 28 (1): 20-30
- [28] Egozi D, Shapira M, Paor G, et al. Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells. *FASEB J*, 2007, 21 (11): 2807-17
- [29] Qin H, Yu T, Qing T, et al. Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2007, 282 (8): 5842-52
- [30] Liu X, Huang J, Chen T, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res*, 2008, 18 (12): 1177-89
- [31] Campbell PA, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, et al. Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *PLoS One*, 2007, 2 (6): e553
- [32] Zhang X, Neganova I, Przyborski S, et al. A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J Cell Biol*, 2009, 184 (1): 67-82
- [33] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*, 2008, 40 (12): 1478-83
- [34] Wang Y, Blueloch R. Cell cycle regulation by microRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res*, 2009, 69 (10): 4093-6
- [35] Card DA, Hebbard PB, Li L, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2008, 28 (20): 6426-38