

ÚLOHA SIGNÁLNÍ DRÁHY INDUKOVANÉ TRANSFORMAČNÍM RŮSTOVÝM FAKTOREM BETA PŘI VZNIKU NÁDORŮ

THE ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA SIGNALING PATHWAY CANCER

FUCHS O.

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn: Transformační růstový faktor beta reguluje proliferaci a diferenciaci různých typů buněk. Hraje důležitou úlohu v embryonálním vývoji a při homeostase tkání v dospělosti. Transformační růstový faktor beta se váže ke specifickým transmembránovým receptorům na povrchu buněk. Receptory mají aktivitu kinas fosforylujících serin a threonin a přenášejí signál přes proteiny Smad. Proteiny Smad se přemísťují po stimulaci ligandem do jádra buněk, kde fungují jako složky transkripčních komplexů a ovlivňují expresi cílových genů. Nádorové buňky často nereagují na antiproliferační vliv transformačního růstového faktoru beta v důsledku mutací nebo chybné regulace exprese genů pro složky uvedené signální dráhy. Mutace v genech pro receptory typu I a II pro transformační růstový faktor beta a v genech pro proteiny Smad jsou nejčastější příčinou ztráty citlivosti buněk na antiproliferační vliv růstového transformačního faktoru beta. Celá řada dalších proteinů a signálních drah ovlivňuje přenos signálu transformačního růstového faktoru beta. Důkladné poznání signální dráhy růstového transformačního faktoru beta může přispět k prevenci a léčení celé řady nádorů.

Klíčová slova: transformační růstový faktor beta (TGFβ), receptory typu I a II pro TGFβ, proteiny Smad, nádory

Summary: Transforming growth factor beta regulates proliferation and differentiation of various types of cells. It plays an important role in embryo development and in homeostasis of adult tissues. The transforming growth factor beta binds to specific transmembrane receptors on the cell surface. The receptors have a serin/threonin kinase activity and transduce signal through Smad proteins. Upon ligand stimulation, Smad proteins translocate into the nucleus where they function as components of transcription complexes and affect the expression of target genes. Tumor cells often escape from the antiproliferative effect of the transforming growth factor beta as a result of mutational inactivation or dysregulated expression of genes for components of its signaling pathway. Mutations in the genes for type I and II transforming growth factor beta receptors and in the genes for Smad proteins dominate in the loss of the cells sensitivity to the antiproliferative effect of the transforming growth factor beta. Several other proteins and signaling pathways also contribute to the transforming growth factor beta signaling. The profound understanding of the transforming growth factor beta pathway may improve cancer prevention and treatment.

Key words: transforming growth factor beta (TGFβ), type I and II TGFβ receptors, Smad proteins, cancer

Úvod

Transformační růstový faktor beta (TGFβ) hraje dvojí úlohu při vzniku nádorů (1-5). V časných stádiích se uplatňuje antiproliferační účinek TGFβ, který potlačuje vznik nádoru. Maligní buňky však často ztrácí svou citlivost k TGFβ a stávají se resistantní na jeho inhibiční vliv na proliferaci buněk. Maligní buňky produkují a sekretují zvýšené množství TGFβ. TGFβ potom naopak podporuje růst nádoru. Působí na netransformované buňky a potlačuje jejich protinádorové imunitní reakce a zvyšuje angiogenesu. Podporuje také vznik metastas.

TGFβ a jeho povrchové buněčné receptory

TGFβ je cytokin, který existuje u savců ve třech isomerních formách (isoformy TGFβ1, TGFβ2 a TGFβ3). Isoformy TGFβ jsou kódovány různými geny, které jsou součástí různých chromosomů (6,7). Exprese isoform TGFβ je tkáňově specifická a závisí též na vývojovém stupni jedince. Přesto často dochází k současné expresi alespoň dvou isoform TGFβ (8). Isoformy TGFβ hrají úlohu v proliferaci a diferenciaci buněk různých tkání a orgánů, v tvorbě extracelulární matrix, ve vývoji kostí, chrupavek a skeletu, v hojení ran, krvetvorbě, imunitní odpovědi a zánětu a také ve vývoji nervové soustavy (6-10). Cílené vyřazení genů pro jednotlivé isoformy TGFβ u embryí myši (gene knockout a získání homozygotní nulové mutace) má za následek smrt ještě před narozením, při narození nebo krátce po narození z důvodu defektní tvorby cév a hematopoesy ve žloutkovém vaku, zánětu a malformací orgánů (8).

Isoformy TGFβ jsou v buňkách syntetizovány ve formě prekurzorů a sekretovány jako latentní komplex (11,12). Uvolnění biologicky aktivního dimeru TGFβ předchází jeho vazba na povrchové buněčné receptory. Aktivace latentního TGFβ je proces složený z více kroků, který probíhá za účasti thrombospondinu 1, plasminu nebo cathepsinu D (11,13,14).

Aktivní homodimer TGFβ se váže na receptor typu II (TβR-II) na povrchu buněk (15). Tento receptor je funkční ve formě homodimeru a je konstitutivní proteinkinasou fosforylující serinové a threoninové zbytky v sekvenci TTSGSGSG molekul receptoru typu I (TβR-I). TβR-I je aktivní také ve formě homodimeru a váže se do komplexu ligandu (TGFβ) s TβR-II (obr.1). TβR-I byl dříve označován ALK5 (activin receptor-like kinase).

Existuje řada proteinů (v povrchové membráně buněk zakotvené betaglykan a endoglin a cytoplasmatický protein FKBP12, pojmenovaný podle schopnosti vázat imunosupresivní látku FK506 a další dosud plně necharakterizované proteiny), které ovlivňují přenos signálu TGFβ na úrovni receptorů (16).

Proteiny Smad

Název proteinů Smad vznikl spojením názvu příbuzných genů u nižších organismů (Sma / small body size/ u *Caenorhabditis elegans* a Mad /mothers against decapentaplegic/ u *Drosophila melanogaster*).

Signální drahou určené nebo také receptory regulované pro-

teiny Smad (R-Smad) jsou přímo fosforylovány receptory typu I pro TGF β (T β R-I) v sekvenci Ser-Ser-X-Ser v C-koncové MH2 oblasti proteinů R-Smad (obr.2). Transmembránový protein SARA (Smad anchor for receptor activation) slouží k ukotvení proteinů Smad 2 a 3 prostřednictvím jejich domény MH2 do komplexu s receptorem typu I (T β R-I) aktivovaným fosforylací pomocí T β R-II (17). Proteiny Smad 2 a 3 fungují jako R-Smad pro přenos signálu TGF β a aktivinů (18-22). Protein Smad 4 je společným mediátorem (Co-Smad) pro všechny signální dráhy využívající proteiny Smad (obr.1). Fosforylované R-Smad tvoří heteromerní komplex s Co-Smad. Vzniklý komplex se přemísť do jádra a zde reguluje transkripci cílových genů (obr.1). Vedle proteinů R-Smad a Co-Smad existuje ještě třetí skupina tzv. inhibičních proteinů Smad, někdy označovaná Anti-Smad (obr.2). Proteiny Smad 6 a 7 jsou těmito inhibitory přenosu signálu rodiny cytokinů TGF β (18-23). Protein Smad 7 přednostně inhibuje signální dráhu TGF β a aktivinů. Smad 6 inhibuje přednostně signální dráhu kostních morfogenetických proteinů, které tvoří důležitou skupinu rodiny cytokinů TGF β a uskutečňují přenos signálu přes proteiny Smad 1, 5 a 8 (R-Smad). Protein Smad 7 tvoří stabilní komplexy s aktivovanými receptory typu I (T β R-I) a tím brání fosforylaci proteinů Smad 2 a 3 (R-Smad), tvorbě komplexu proteinů R-Smad-Co-Smad a transportu tohoto komplexu proteinů Smad do jádra buněk. N-koncová oblast MH1 (obr.2) u proteinů Smad 3 a 4 vykazuje vazebnou aktivitu k DNA. Smad 2 se k DNA váže jen prostřednictvím jiného vazebného nebo transkripčního faktoru (18-22). Na interakci proteinů R-Smad s transkripčními faktory, koaktivátory nebo korepresory transkripce se podílí obvykle oblast MH2 proteinů R-Smad, v případě interakce proteinu Smad 3 s transkripčními faktory AP1, ATF2, SP1, SP3, TFE3 a s receptorem pro vitamin D však jde o oblast MH1 proteinu Smad 3 (21). Oblast MH1 proteinů R-Smad nese i signál pro translokaci do jádra a váže importin β , který přesun do jádra zprostředkuje (24,25).

Vliv dalších signálních drah na přenos signálu TGF β

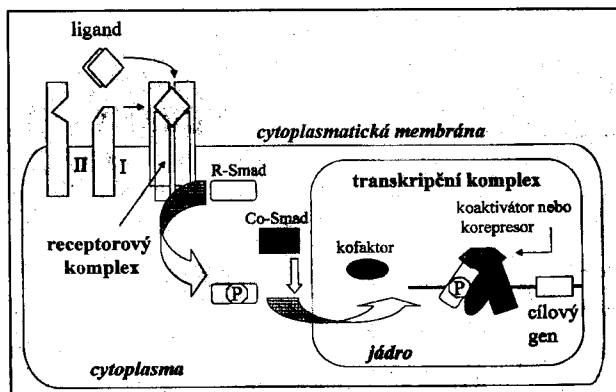
Přenos signálu TGF β prostřednictvím proteinů Smad je ovlivněn dalšími signálními drahami (obr.3). Signální dráha protoonkogenu Ras indukovaná růstovými faktory EGF (epidermal growth factor) a HGF (hepatocyte growth factor) vede k aktivaci ERK (extracellular signal-regulated kinase). ERK náleží do skupiny kinas MAPK (mitogen-activated protein kinases). Tato kinasa fosforyluje serinové a threoninové zbytky v motivech bohatých na prolinové zbytky ve spojovací oblasti (linker) proteinu Smad 2 i proteinu Smad3 (15,21). Fosforylace spojovací oblasti proteinů Smad vede k akumulaci fosforylovaných Smad v cytoplasmě a k neschopnosti přejít do jádra a podílet se na regulaci transkripce cílových genů (15,21). Fosforylace spojovacích oblastí má proto obrácený účinek než samotná aktivace proteinů R-Smad fosforylací sekvence Ser-Ser-X-Ser na C-konci proteinů R-Smad účinkem aktivovaného T β R-I.

Byl však popsán i obrácený účinek kinasy JNK (c-Jun N-koncová kinasa) na protein Smad 2. Fosforylací proteinu Smad 2 pomocí této kinasy aktivované stresem se naopak podpoří interakce Smad2-Smad4 a akumulace tohoto komplexu v jádře buněk (4,15,21).

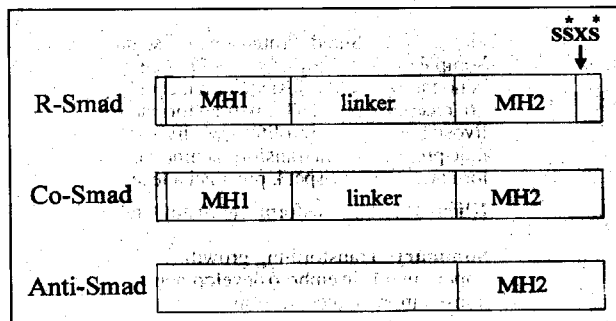
Přenos signálu multifunkčního cytokinu LIF (leukemia inhibitory factor) vede k aktivaci proteintyrosinkinas rodiny JAK (Janus kinasy). Aktivované JAK potom fosforyluje transkripční faktor STAT3 (signal transducer and activator of transcription), který v jádře v kooperaci s proteinem Smad1 a acetylasou histonů stimuluje transkripci cílových genů (21).

Interakce proteinů Smad v transkripčních komplexech s proteiny podílejícími se na tvorbě nádorů

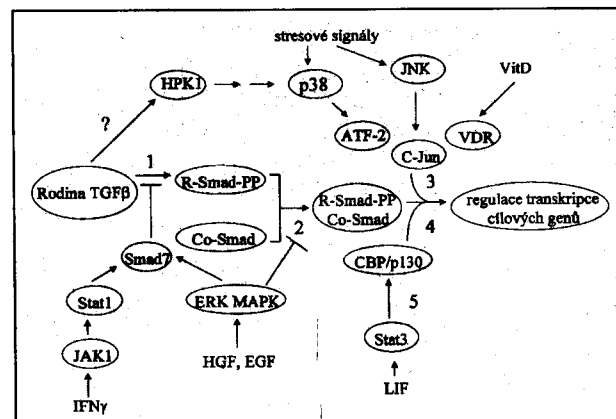
Jak již bylo výše uvedeno, proteiny Smad interagují s celou řadou kofaktorů, transkripčních faktorů, koaktivátorů a kore-



Obr.1: Schematické znázornění signalizační dráhy cytokinu TGF β .



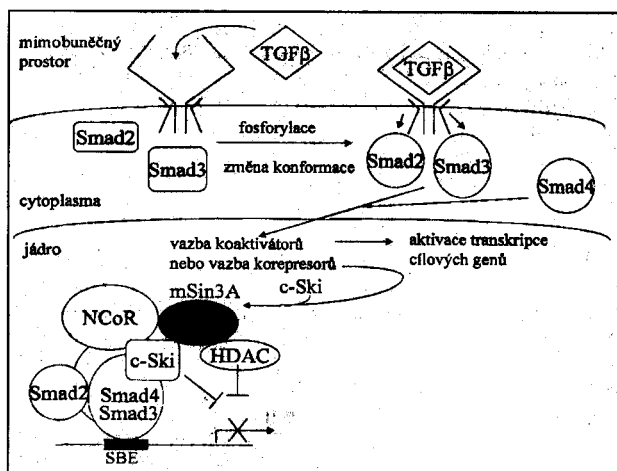
Obr.2: Známkování oblastí proteinů Smad a sekvence Ser-Ser-X-Ser u proteinů R-Smad, kde jsou hvězdičkou označeny serinové zbytky, které jsou fosforylovány receptorem typu I pro TGF β (T β R-I).



Obr.3: Propojení a vzájemné interakce signálních dráhy cytokinů rodiny TGF β s celou řadou dalších signálních drah. 1- fosforylace proteinů R-Smad pomocí T β R-I; 2- akumulace komplexu proteinů R-Smad-Co-Smad v jádře buňky; 3- interakce komplexu R-Smad-Co-Smad s transkripčními faktory ATF-2, c-Jun a dalšími proteiny např. s VDR, receptorem pro vitamin D (VitD); 4- interakce komplexu R-Smad-Co-Smad s koaktivátory transkripce, proteiny CBP a p300; 5- interakce komplexu R-Smad-Co-Smad s transkripčním faktorem Stat 3. Použité zkratky: IFN β , interferon β ; LIF, faktor inhibující leukemii, multifunkční cytokin, který inhibuje proliferaci myšičích leukemických myeloidních buněk a stimuluje jejich diferenciaci; HPK1, hematopoetická progenitorová kinasa 1; Stat1 a 3, transkripční faktory (signal transducers and activators of transcription); ostatní zkratky vysvětleny v textu.

presorů transkripce v transkripčních komplexech (obr.1, obr.4) a podle toho ovlivňují expresi cílových genů. Zde se budeme zabývat jen interakcemi, které souvisí nebo by mohly souviset s tvorbou nádorů.

Nedávno byla popsána interakce signální dráhy proteinů Wnt (wingless-type integration site family, kandidáti protoonkogenu), jejichž signální dráha se podobá signální dráze proteinu



Obr. 4: Represe transkripce genů odpovídajících na proteiny Smad 2,3 a 4 pomocí komplexu obsahujícího uvedené proteiny Smad v asociaci s korepresorem transkripce, proteinem c-Ski a deacetylase histonů.

Wingless u *Drosophila melanogaster*) a signální dráhy TGFβ (26). Protein Smad 4 byl precipitován společně s proteiny β-catenin a Lef1 (lymphoid enhancer binding protein 1, který asociuje s TCF, T-cell factor) pomocí protilátky proti β-cateninu (26). Proteiny β-catenin a Lef1/TCF se podílí na přenosu signálu proteinů Wnt (26). U *Xenopus laevis* jsou u promotorové oblasti genu twin vazebná místa jak pro Lef1, tak i pro Smad a oba tyto transkripční faktory regulují transkripci genu twin (26). Protoonkogenní účinek proteinů Wnt byl objeven již před 19 lety (27). Například aktivace genů pro Wnt-1, Wnt-3 a Wnt-10b retrovirální insercí způsobila tvorbu nádorů mléčné žlázy u myši (27-29). Interakce proteinů Lef1, Smad 3 a Smad 4 navzájem a s DNA byla nalezena i u savčích buněk, ale její význam je zatím nejasný (30).

Proteiny Smad také tvoří transkripční komplexy s acetylase a deacetylase histonů (obr.4), které ovlivňují strukturu chromatinu a tím aktivují nebo naopak inhibují transkripci. Acetylase histonů usnadňuje transkripci tím, že rozvolňuje strukturu chromatinu a umožňuje transkripčním faktorům přístup k templátu DNA (31-33). Naopak deacetylase histonů působí represí transkripce, protože způsobí kondensaci chromatinu a tím brání transkripčním faktorům v přístupu k DNA (34-36). Acetylase a deacetylase histonů často interagují s transkripčními faktory podílejícími se na vzniku nádorů (37-40). Proteiny Smad 2 a 3 přímo interagují (41-43) s acetylase a deacetylase histonů (CBP, cAMP response element binding protein a p300). TGFβ indukuje asociaci deacetylase histonů s proteiny Smad, která je zajištěna přes další kofaktory, kterými jsou protoonkoproteiny Ski a SnoN (44-49). Gen pro c-Ski je buněčným homologem retrovirálního onkogenu ptačího Sloan-Kettering retroviru. Tento retrovirus způsobuje transformaci fibroblastů kuřecího embrya a hypertrofii svalů u myši. Protoonkoprotein SnoN (Ski-related novel protein) je příbuzný protein k protoonkoproteinu Ski (45,46).

V dvouhybridním systému na zjišťování interakcí proteinů bylo nalezeno, že protoonkoprotein Ski interaguje s proteiny Smad 2, 3 přenášejícími signál TGFβ jak bylo výše uvedeno. V buňkách transformovaných onkogenem Ski byl v-Ski nalezen v komplexu s proteinem Smad 3 a došlo k akumulaci uvedeného komplexu v jádře buněk bez přidání TGFβ (49). Proteiny Smad 2 a 3 tvoří heterooligomery se Smad 4 a přemísťují se do jádra po účinku TGFβ. Jaderný protoonkoprotein Ski přímo interaguje s proteiny Smad a pomocí vazby dalšího proteinu N-CoR (nuclear transcriptional corepressor) asociovaného s proteinem mSin3A a deacetylase histonů inhibuje transkripci cílových genů (obr.4) odpovídajících na uvedené proteiny Smad aktivované účinkem TGFβ (47). Zvýšená exprese genu pro protein Ski a tedy zvýšené množství tohoto

onkoproteinu způsobí, že buňky se stanou resistantní na anti-proliferativní účinek TGFβ (47).

Protoonkoprotein SnoN byl obdobně jako protoonkoprotein Ski nalezen v jádře buněk v komplexu s proteiny Smad 2 a 3 a s proteinem N-CoR asociovaným s deacetylase histonů. Stabilita proteinu SnoN se snižuje po působení TGFβ, ale hladina mRNA pro SnoN naopak stoupá. To má za následek rychlou degradaci SnoN ihned po působení TGFβ a naopak vzrůst hladiny SnoN po několika hodinách účinku TGFβ (46). Protoonkoprotein SnoN způsobí inhibici transkripce genů odpovídajících na proteiny Smad obdobně jako protoonkoprotein Ski (45,46).

Oba uvedené protoonkoproteiny, Ski a SnoN, brání interakci proteinů Smad 2 a 3 s koaktivátory transkripce, kterými jsou výše uvedené proteiny CBP a p300 s aktivitou acetylase histonů (44,47,50,51).

Nádory epiteliálních a lymfoidních tkání se vyznačují resistencí k antiproliferativnímu účinku TGFβ (1-5). K uvedené resistenci na inhibiční účinek TGFβ na proliferaci buněk nedochází u myeloidních leukemií (52-54). U chronické myeloidní leukemie (CML) v myeloidní krizi a u akutní myeloidní leukemie (AML) dochází skoro k úplnému zastavení růstu mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve nebo kostní dřeně po působení TGFβ1 (80 pM) in vitro s jistými rozdíly u jednotlivých pacientů a v závislosti na použitém růstovém faktoru (54). Inhibice buněčného růstu po působení TGFβ1 vzrůstá s klonální evolucí hematologických maligních chorob (54).

Byla popsána interakce proteinů Smad s dvěma transkripčními faktory (AML1 a Evi-1) a s jejich fúzními proteiny s dnes již známou úlohou u akutní myeloidní leukemie (55). Translokace mezi chromosomy 3 a 21 (t(3;21)/q26;q22) spojená s blastickou krizí chronické myeloidní leukemie má za výsledek tvorbu chimerních transkripčních faktorů AML1/Evi-1 a AML1/MDS1/Evi-1. Tyto chimerní proteiny hrají klíčovou úlohu v transformaci hematopoetických buněk (55,56), protože inhibují přenos signálu TGFβ. Chromosomální translokace vedoucí k expresi chimerních transkripčních faktorů jsou časté u nádorových buněk. Chimerní proteiny přes svou první oblast s motivem Cys2His2-typu zinkového prstu v části Evi-1 interagují s proteinem Smad 3 a potlačují jeho aktivitu v přenosu signálu TGFβ (55,56). Samotný protoonkoprotein Evi-1 obsahuje deset uvedených motivů zinkových prstů (57,58) ve dvou oblastech (v první doméně sedm motivů zinkových prstů a ve druhé doméně zbývajících tří). Při zvýšené expresi protoonkoproteinu Evi-1 v krysích fibroblastech dochází k jejich transformaci (59). Zvýšená exprese protoonkoproteinu Evi-1 blokuje diferenciaci myši myeloidní buněčné linie na granulocyty (60) po působení faktoru stimulujícího růst kolonií granulocytů (G-CSF). Exprese protoonkoproteinu Evi-1 je většinou nedetekovatelná v normálních hematopoetických buňkách (55). U leukemií dochází k četným změnám uspořádání chromosomů (translokacím a inversím). Lidský gen pro protoonkoprotein Evi-1 je umístěn na chromosomu 3q26 a změny uspořádání této oblasti t(3;21), t(3;12), t(3;3) a inv(3) často aktivují expresi Evi-1 u myeloidních leukemií a myelodysplasií (56,57,61). Chimerní protein AML1/Evi-1 potlačuje transaktivaci samotným protoonkoproteinem AML1 a to vede k bloku diferenciace myeloidních buněk (61). Komplementární (antisense) oligonukleotidy k mRNA pro Evi-1 způsobily částečné obnovení citlivosti linie lidských myeloidních leukemických buněk na TGFβ (55).

Protoonkoprotein Evi-1 interaguje vedle proteinu Smad 3 také s korepresorem CtBP (C-terminal binding protein) a tato interakce je nezbytná pro účinnou inhibici přenosu signálu TGFβ proteinem Smad 3 (62). Zatím není známo jak CtBP působí jako korepresor. Byly navrženy dva modely pro tuto funkci CtBP. V prvním modelu CtBP váže deacetylase histonů a ve druhém účinkuje jako můstek mezi specifickými represoro-

vými proteiny a uvedeným komplexem Smad 3 - Evi-1 - CtBP a způsobí kondensaci chromatinu i bez deacetylas histonů (62). Fysiologický antagonistá protoonkoproteinu Evi-1 je fúzní protein MDS1/Evi-1, který naopak ještě zvyšuje antiproliferační účinek TGFβ (56). Chimerní protein AML1/Evi-1 však naopak potlačuje inhibiční účinek TGFβ na proliferaci leukemických buněk (55). Onkoprotein CBF (core binding factor) obsahuje subjednotky AML1 a CBFβ (63). Onkoprotein CBF (63) interaguje také s oblastí enhanceru polyomaviru nebo viru, způsobujícího leukemii u myši (Moloney virus). Onkoprotein CBF je proto také označován PEBP2 (polyoma enhancer binding protein 2). Onkoprotein AML1 je tedy podjednotkou β onkoproteinu CBF a nese proto také pojmenování CBFβ2, CBFA2, PEBP2βB nebo Runx-1 (63). Gen AML1 na chromosomu 21q22 je jedním z nejvíce mutovaných genů souvisejících s lidskou leukémií. Odpovídající podjednotka β onkoproteinu CBF obsahuje vazebné místo k DNA (doména Runt) a transkripční oblast (64). Podjednotka β zvyšuje vazebnou aktivitu podjednotky α k DNA (63). Onkoprotein CBF zvyšuje například transkripci z promotoru genu pro thymidinkinasu v myeloidních buňkách asi třikrát (63). Onkoprotein CBF má schopnost interagovat (63) s dalšími transkripčními faktory (například Ets-1, PU 1, c-myc) a s koaktivátory transkripce (například p300 s aktivitou acetylas histonů). K expresi onkoproteinu AML1 dochází v primitivních hematopoetických buňkách, ale není syntetisován ve zralé kostní dřeni (63). Druhá podjednotka, onkoprotein CBFβ, je syntetisován ve všech buňkách. Embrya myši postrádající funkční geny pro podjednotky CBF časné umírají v důsledku zablokované hematopoese a lymfopoese (65,66). Vedle podjednotky AML1 existují ještě podjednotky AML2 a AML3, které též asociují se stejnou podjednotkou β onkoproteinu CBF (63). Všechny tři onkoproteiny AML, zvláště pokud jsou syntetisovány ve zvýšené míře, mohou být imunoprecipitovány společně s proteiny R-Smad. Onkoproteiny AML1 a AML2 kooperují s proteiny Smad na indukci přesmyku imunoglobulinu A (IgA) ve sleziných buňkách B aktivací promotoru genů IgA1 a IgA2 přes enhancer Iβ (67,68). Enhancer Iβ obsahuje vazebná místa pro AML1 a AML2 a pro protein Smad3 (67,68). Konečným výsledkem chromosomální translokace t (8; 21) u AML je vznik chimerního transkripčního faktoru AML1/ETO. N-koncová část proteinu AML1, která zůstává zachována v proteinu AML1/ETO, obsahuje vazebnou oblast pro proteiny Smad (Smad2, Smad3). Tato oblast je homologní k proteinu FAST (forkhead activin signal transducer), který se váže k DNA a současně interaguje s proteiny Smad (69). Gen ETO se nachází na chromosomu 8. Výsledkem jeho exprese je jaderný fosfoprotein ETO obsahující motiv zinkových prstů, který je schopen interagovat s jadernými korepresory N-CoR a Sin3A a deacetylasami histonů (69). Funkčním důsledkem vzniku fúzního proteinu AML1/ETO je tedy přeměna (69) aktivátoru transkripce AML1 (interaguje s transkripčními faktory a acetylasami histonů) na represor transkripce AML1/ETO (interaguje s korepresory transkripce a deacetylasami histonů). Podobné a zatím ještě nepopsané interakce mohou hrát důležitou úlohu v diferenciaci myeloidních buněk. Jistě budou objeveny i další fúzní proteiny vzniklé zatím nepopsanými translokacemi u myeloidní a lymfoblastické leukémie.

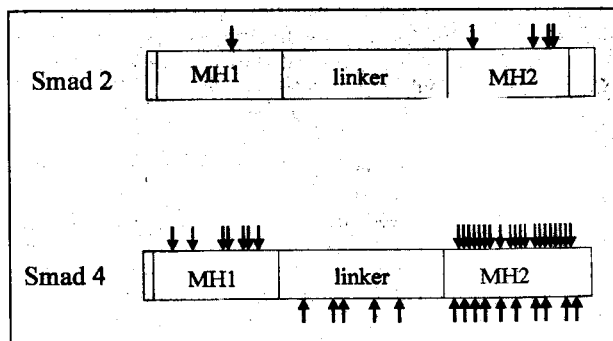
TGFβ ve funkci supresoru nádorů

Inaktivující mutace ve členech signální dráhy TGFβ byly objeveny u různých druhů nádorů. Obvykle souvisí spíše s progresí maligního procesu než s jeho iniciací. Mutace v receptoru typu II pro TGFβ (TβR-II) mohou ovlivnit oblast kinasy nebo oblast mikrosatelitních opakováních se sekvencí v mimobuněčné části TβR-II (70-81). Zpravidla se jedná o somatické mutace, ale byl popsán i případ vrozené mutace v syndromu HNPCC se zvýšenou dispozicí k tvorbě dědičného (hereditárního) nepolyposního kolorektálního karcinomu (82). Polymorfismus genu pro receptor typu I pro TGFβ (TβR-I) je spojen se zvý-

šeným rizikem tvorby nádorů (83,84). Somatická mutace v kinasové oblasti TβR-I u metastasujících karcinomů prsu byla také popsána (85), ale nebyla potvrzena v jiné laboratoři (86). Mutace v genu pro TβR-I byla nalezena také u některých karcinomů prostaty (87) a u asi 31 % karcinomů vejcovodů (88), kde byl nalezen i polymorfismus v genu pro TβR-II (88). Hladina receptorů typu I a II pro TGFβ (TβR-I a TβR-II) je také regulována na transkripční a postranskripční úrovni u různých typů nádorů (77, 89-93). Pokles hladiny receptorů pro TGFβ může souviset s horší prognosou přežití pacienta (94). Methylace promotorové oblasti genů pro receptory TGFβ nebo jejich mutace může být odpovědná za sníženou expresi genů pro TβR-I a TβR-II (95,96). Snížená transkripce genu pro TβR-II byla popsána u Ewingova sarkomu a příbuzných primitivních neuroektodermálních nádorů (97). Chromosomální translokace spojí gen pro oblast I Ewingova sarkomu (22q-12) s genem pro transkripční faktor ETS (FLI-1, Friend leukemia virus integration 1) a vznikne chimerní transkripční faktor EWSR1/FLI-1 (97), typický pro četné nádory jak již bylo výše uvedeno v případě myeloidních leukemií. Vzniklý chimerní transkripční faktor brání aktivaci promotoru genu pro TβR-II pomocí transkripčního faktoru Fli-1 (97).

Protein Smad 4 (Co-Smad viz obr. 1 a obr.2) byl prvním nalezeným proteinem Smad u savců. Byl nalezen při detekci kandidátního genu pro nádorový supresor u karcinomu slinivky břišní. V oblasti chromosomu 18q21.1 s častými delecemi nebo mutacemi u maligních buněk slinivky břišní byl nalezen gen DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma, locus 4). Tento gen (98) byl homologní s geny pro Sma a Mad a byl později pojmenován SMAD 4. Gen SMAD 4 je somaticky inaktivován asi u 50% karcinomů slinivky břišní, 20% karcinomů tlustého střeva, 10% karcinomů plic (98-104), ale je jen vzácně inaktivován u ostatních druhů nádorů (105,106). Vrozené mutace genu pro protein Smad 4 jsou zodpovědné za některé případy dědičné juvenilní polyposní choroby, autosomálně dominantního onemocnění se zvýšeným rizikem vzniku gastrointestinálních karcinomů (107-109). Mutace v genu pro protein Smad4 zřejmě nejsou příčinou dědičné formy karcinomu slinivky břišní (110). Dosud objevené mutace (změna čtecího rámce v důsledku mutací viz horní šipky na obr.5 a nesmyslné mutace /bez smyslu/, např. zavedení stop kodonu a delece viz dolní šipky na obr.5) proteinu Smad 4 se vyskytují v oblasti MH1, spojovací oblasti i v oblasti MH2 (123). Přesný popis těchto mutací a delecí je uveden v tabulce č.1.

Gen pro protein Smad2 je umístěn také na chromosomu 18q21.1, tedy v oblasti časté ztráty alely u různých nádorů (105). Mutace genu pro protein Smad2 byly popsány u malé části karcinomů tlustého střeva a plic (111,112) a jsou schematicky znázorněny na obr.5 (význam šipek je stejný jako u mutací a delecí u proteinu Smad4). Přesný popis těchto mutací a delecí je uveden v tabulce č.2.



Obr.5: Mutace v genech pro proteiny Smad2 a Smad 4 u karcinomů (viz text). Horní šipky u příslušného genu značí mutace způsobující změnu čtecího rámce a dolní šipky u příslušného genu znázorňují mutace bez smyslu (nesmyslné mutace), např. zavedení stop-kodonu a delece. Přesný popis mutací je uveden v tabulkách č.1 a 2.

Tabulka č.1: Mutace v genu pro protein Smad 4

Kodon	Mutace	Odpovídající změna aminokyseliny	Umístění nádoru
43	TTG na TCG	Leu na Ser	slinivka břišní
100	AGG na ACG	Arg na Thr	slinivka břišní
115	TGT na CGT	Cys na Arg	tlusté střevo
130	GTC na GAC	Pro na Ser	tlusté střevo
162	delece 2 bp	zavedení stop-kodonu	slinivka břišní
168	GGA na TGA	Gly na stop-kodon	tlusté střevo
195	TACA na TAA	Tyr na stop-kodon	slinivka břišní
202-203	delece 4 bp	zavedení stop-kodonu	plíce
269-270	ACT na ACTT	zavedení stop-kodonu	tlusté střevo
336-338	delece 2 bp (GA)	zavedení stop-kodonu	tlusté střevo
339-343	delece 15 bp	posun čtecího rámce	tlusté střevo
343	TCA na TGA	Ser na stop-kodon	slinivka břišní
343	delece 2 bp	zavedení stop-kodonu	slinivka břišní
351	GAT na CAT	Asp na His	slinivka břišní
358	GGA na TGA	Gly na stop-kodon	tlusté střevo, slinivka břišní
361	CGC na TGC	Arg na Cys	tlusté střevo
361	CGC na CAC	Arg na His	tlusté střevo
363	TGT na AGT	Cys na Ser	tlusté střevo
369	AAT na GAT	Asn na Asp	slinivka břišní
370	GTC na GAC	Val na Asp	tlusté střevo
406	GCG na ACG	Ala na Thr	slinivka břišní
412	TAC na TAG	Tyr na stop-kodon	slinivka břišní
415-416	delece 4 bp	zavedení stop-kodonu	tlusté střevo
420	CGT na CAT	Arg na His	plíce
441	CGT na CCT	Arg na Pro	plíce
442	CAG na TAG	Gln na stop-kodon	tlusté střevo
445	CGA na TGA	Arg na stop-kodon	tlusté střevo
447-455	delece 25 bp	zavedení stop-kodonu	tlusté střevo
450-459	delece 28 bp	zavedení stop-kodonu	tlusté střevo
457	GCA na TCA	Ala na Ser	slinivka břišní
483	AGT na AAT	změna sestřihu pre-mRNA	slinivka břišní
493	GAT na CAT	Asp na His	slinivka břišní
497	CGC na CAC	Arg na His	tlusté střevo
507	AAA na CAA	Lys na Gln	tlusté střevo
515	AGA na GGA	Arg na Gln	tlusté střevo
515	AGA na TGA	Arg na stop-kodon	slinivka břišní
516	CAG na TAG	Gln na stop-kodon	tlusté střevo
516-518	delece 8 bp	zavedení stop-kodonu	slinivka břišní
525	ATT na GTT	Ile na Val	nosohltan
526	GAA na TAA	Glu na stop-kodon	nosohltan
528/529	delece 4 bp	zavedení stop-kodonu	slinivka břišní
540-542	delece 7 bp	zavedení stop-kodonu	tlusté střevo

Tabulka č. 2: Mutace v genu pro protein Smad 2

Kodon	Mutace	Odpovídající změna aminokyseliny	Umístění nádoru
133	CGC na TGC	Arg na Cys	tlusté střevo
345-358	delece 45 bp	posun čtecího rámce	tlusté střevo
346	TTT na GTT	Fen na Val	tlusté střevo
431-454	delece 9 bp	posun čtecího rámce	plíce
440	CTT na CGT	Leu na Arg	tlusté střevo
445	CCT na CAT	Pro na His	tlusté střevo
450	GAC na GAG	Asp na Glu	tlusté střevo
450	GAC na CAG	Asp na His	plíce

Mutace genu pro protein Smad 3 nebyly zatím nalezeny, přestože je tento gen umístěn na chromosomu 15q21-22 v oblasti časté ztráty alely u různých typů nádorů (100,102,113). U myši s homozygotní delecí genu pro Smad 3 dochází ke vzniku agresivních metastasujících kolorektálních karcinomů (114). Mutace v genech pro inhibiční proteiny Smad (proteiny Smad 6 a Smad 7) nebyly zatím nalezeny. Gen pro protein Smad 6 je umístěn na chromosomu 15q21-22 a gen pro protein Smad 7 na chromosomu 18q21.1 (115,116). Oba tyto geny leží v oblasti časté ztráty alely u nádorů. Zvýšená exprese inhibičních proteinů Smad 6 a 7 byla pozorována u karcinomů slinivky břišní (117,118).

Mechanismus, jakým mutace v genech pro proteiny Smad ovlivňují přenos signálu TGFβ, je zatím většinou neznámý. Mutace konzervativního argininového zbytku v oblasti MH1

proteinů Smad2 a Smad4 snižují stabilitu těchto proteinů Smad (119). V uvedeném případě se jednalo o záměnu argininu za cystein v poloze 133 proteinu Smad 2 a tato mutace byla nalezena u karcinomu tlustého střeva a o záměnu argininu za threonin v poloze 100 proteinu Smad 4, která byla nalezena u karcinomu slinivky břišní (119). Oba proteiny Smad se stávají následkem uvedených mutací předurčeny k rychlé degradaci proteasomy po předchozí ubiquitinaci (119). Mutace v proteinech R-Smad nalezené u karcinomů mohou také bránit fosforylaci a tím aktivaci proteinů R-Smad účinkem kinasové aktivity proteinu TβR-I (111), ovlivňovat oligomerizaci proteinů Smad a tvorbu funkčního komplexu R-Smad-Co-Smad (120), stabilizovat intramolekulární interakce mezi doménami MH1 a MH2 proteinů Smad a tím držet proteiny Smad v neaktivní formě (121) nebo ovlivňovat vazbu proteinů Smad k DNA a interakce s dalšími transkripčními faktory nebo koaktivátory či korepresory transkripce (122,123).

TGFβ a buněčný cyklus

Inhibiční účinek TGFβ na proliferaci buněk spočívá v prodloužení fáze G1 buněčného cyklu (2, 124). Produkt exprese genu pro nádorový supresor retinoblastomu (pRB) inhibuje přechod buněk z fáze G1 do fáze S pokud není fosforylován. Protein RB působí přes vazbu s transkripčními regulátory (faktor E2F a další). Fosforylací pRB je zrušena interakce s faktorem E2F a dojde k aktivaci transkripce řady genů, jejichž produkty exprese jsou nutné pro vstup buněk do fáze S buněčného cyklu (2,125,126). Účinek TGFβ drží pRB v nefosforylované formě tím, že ovlivňuje expresi cyklinů ve fázi G1, na cyklinu závislých kinas (cdk) a inhibitorů cdk řadou transkripčních, translačních a postranslačních mechanismů (2). TGFβ blokuje expresi cyklinu A a cyklinu E ve fázi G1 buněčného cyklu, inhibuje aktivaci cdk2 a potlačuje syntézu cdk4, tedy hlavních katalytických podjednotek cyklinů A,E a D, které fosforylují pRB a stimulují přechod do fáze S buněčného cyklu (126). Inhibiční účinek TGFβ na proliferaci buněk zesilují inhibitory cdk. TGFβ stimuluje expresi (124) těchto inhibitorů cdk (p21/WAF1, CAP20, CIP1, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p15^{Ink4B}).

TGFβ a apoptosa

Zvýšená koncentrace TGFβ vyvolává apoptosu (programovanou buněčnou smrt) u celé řady buněk. Buňky nádoru s poruchou přenosu signálu TGFβ jsou rezistentní k apoptotickému účinku TGFβ. Reaktivní formy kyslíku a kaspasy hrají hlavní úlohu v apoptose indukované pomocí TGFβ (127-129). Úloha dalších proapoptotických nebo antiapoptotických molekul je však již závislá na druhu buněk (130-135). Proapoptotický vliv TGFβ je nezávislý na p53 (134) i když zvýšená exprese p53 po účinku TGFβ byla též popsána (130). Po působení TGFβ1 byla ukázána snížená exprese proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L, které inhibují apoptosu (131-134). Byla však popsána i nezměněná exprese těchto proteinů z rodiny Bcl-2 po působení TGFβ (135). Exprese proteinů Bax a Bak ze stejné rodiny Bcl-2, které však stimulují apoptosu, nebyla po působení TGFβ změněna (133,135). Při apoptose vyvolané účinkem TGFβ1 dochází ke zvýšení průchodnosti mitochondriálních membrán účinkem reaktivních forem kyslíku (128). Cytochrom c je uvolněn z mitochondrií do cytoplasmy a zde indukuje faktor aktivující apoptotické proteasy (Apaf-1), který oligomerisuje a tvoří s kaspasou 9 proteinový komplex o velikosti 700 kDa. Komplex se nazývá apoptosom a aktivuje kaskádu dalších kaspas (129,136). Kaspasy jsou cytoplasmatické cysteinové proteasy štěpící proteiny za zbytkem kyseliny asparagové. Kaspasy štěpí tzv. substráty smrti („death substrates“), ke kterým patří např. aktin, poly(ADPribosa)polymerasa aj.

TGFβ a angiogenesa

Soustava trubic (cév a žil) vystlaných endothelem zajišťuje průtok krve podle potřeb organismu, jednotlivých tkání a orgá-

nů. Kardiovaskulární systém je prvním vyvinutým a funkčním systémem během embryogeneze. Za tvorbu cév a žil jsou odpovědné dva procesy: vaskulogeneza a angiogeneza. Vaskulogeneza je omezena na časný vývoj embrya a zahrnuje diferenciaci mesodermálních prekursorů na endotheliální buňky. Angiogeneza může probíhat i po narození jedince a v dospělosti a představuje tvorbu nových kapilár z jichž existujících kapilár.

Nádory si vytvářejí vlastní endogenní mikrocirkulaci. Angiogeneza hraje důležitou úlohu při růstu nádorů. Folkman (137) již v roce 1971 ukázal, že u nádorů větších než 2-3 mm dochází k angiogeneze z důvodů nedostatečné difuze kyslíku a živin. Dnes je již jasné, že angiogeneza není jen nezbytná pro růst nádoru, ale také souvisí s přeměnou premaligního nádoru na zhoubný nádor s tvorbou metastáz (138,139). Zvýšená exprese cytokinu VEGF (vascular endothelial growth factor), který hraje hlavní úlohu v angiogeneze, souvisí s růstem nádoru a špatnou prognosou na přežití pacientů. Celá řada dalších cytokinů vedle VEGF ovlivňuje angiogenní aktivitu. Patří sem růstový faktor fibroblastů, endotheliální růstový faktor destiček, angiogenin a TGFβ (138,139).

TGFβ1 indukuje angiogenezu *in vitro* (140-142) a *in vivo* (143,144). Nedávno bylo ukázáno na souboru pacientů s adenokarcinomem plic, že TGFβ1 pozitivně ovlivňuje angiogenezu nádoru a hladina TGFβ1 je důležitým prognostickým faktorem pro tyto pacienty (145). Hladina TGFβ1 měřená imunohistochemickou analýzou byla značně zvýšena u pacientů s metastasou do lymfatických uzlin a u pokročilejších stadií adenokarcinomu plic a byla podstatně vyšší než v normální tkáni plic (145).

Úlohu TGFβ ve vaskulogeneze potvrdily pokusy na myších s cíleně vyřazeným genem pro TGFβ1 (146) nebo pro TβR-II (147). Tyto mutace jsou letální v embryonálním vývoji v důsledku poruchy tvorby žloutkového vaku a hematopoese.

TGFβ a imunitní systém

TGFβ potlačuje aktivaci, proliferaci a funkci lymfocytů *in vivo* (148,149). Tyto nálezy byly potvrzeny pokusy na myších homozygotních na nulovou mutaci TGFβ1 (TGFβ1 gene knockout). Tyto myši umírají v prenatálním období jak bylo výše uvedeno nebo několik týdnů po narození na záněty způsobené masivní proliferací lymfocytů (150).

Aktivní exogenní TGFβ je schopen potlačit určité imunitní odpovědi *in vivo* (151) a zabránit autoimunitním onemocněním (152,153). Nádory sekretující TGFβ nebo nádory stimující sekreci latentního TGFβ hostitelskými buňkami v sousedství nádorů rychleji rostou (154). Rostoucí nádory stimulují B lymfocyty k sekreci IgG a IgG-TGFβ proti epitopům k jejichž expresi dochází u nádorových buněk (155,156). IgG-TGFβ se váže na Fc receptory na mononukleárních buňkách „Veto“ kostní dřeni. Tyto buňky interagují s nádorově specifickými cytolytickými T lymfocyty, aktivují TGFβ a tím zabrání aktivaci a proliferaci cytolytických T lymfocytů (155,156). Aktivované cytolytické T lymfocyty jsou nezbytné pro eliminaci nebo kontrolu růstu většiny nádorů.

TGFβ je důležitý pro homeostasu různých systémů a proto inhibice TGFβ pomocí neutralizační protilátky proti aktivnímu TGFβ se nezdá nejlepším přístupem i když byla pokusně použita *in vivo* (156). Lepším přístupem k zabránění TGFβ v potlačení imunitní odpovědi na nádorové buňky se zdá být bližší charakterisace buněk „Veto“ a nalezení způsobu jak zabránit jejich negativní funkci na cytolytické T lymfocyty (156).

Účinek TGFβ v různých stádiích tvorby nádorů

Řada modelových systémů *in vitro* a *in vivo* ukázala, že TGFβ inhibuje proliferaci buněk v raných stádiích tvorby nádoru. Cílené vyřazení genu pro TGFβ1 vedlo k rychlému malignímu procesu u tvořících se myších karcinomů kůže a tlustého

střeva (157,158). Naopak již vytvořené nádory se často stanou resistantními na účinek TGFβ i když sekretují velká množství tohoto cytokinu (1-5). Zvýšená hladina TGFβ je potom negativním prognostickým faktorem u většiny typů nádorů. Nádorový supresor (von Hippel-Lindau) snižuje poločas životnosti mRNA pro TGFβ1 a sekreci cytokinu TGFβ (159). Bylo to zjištěno transfekcí nemutovaného genu pro uvedený nádorový supresor do linie buněk karcinomu ledviny defektních na tento nádorový supresor (159). Protilátka proti TGFβ snížila angiogenezu a redukovala objem nádoru u imunodeficitních myší s inokulovanou linií buněk karcinomu ledviny defektních na uvedený nádorový supresor (159). Snižením endogenní produkce TGFβ1 v linii krysích buněk karcinomu prostaty vnesením tzv. antisense DNA pro TGFβ1 dochází k obnovení imunogenicity nádorových buněk (160).

Obdobná strategie snížení hladiny TGFβ pomocí antisense RNA nebo antisense oligonukleotidů byla použita i při experimentální indukci regrese řady dalších nádorů (161-163). Naopak experimentálně vyvolaná zvýšená exprese TGFβ1 v linii lidských buněk karcinomu prostaty zvýšila angiogenezu a schopnost metastasovat po inokulaci do imunodeficitních myší (164).

Transmembránový protein BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) tvoří heterodimery s receptory typu I (TβR-I) a tím brání jejich aktivaci pomocí TβR-II (165) a zeslabuje přenos signálu TGFβ. Exprese proteinu BAMBI je snížena v liniích buněk melanomu i v primárních nádorech a souvisí s potenciálem buněk metastasovat (166). To opět ukazuje, že zvýšený přenos signálu u již vytvořených nádorů souvisí s jejich metastasujícím fenotypem. Zvýšená exprese zřejmě funkčních TβR-II u lidských karcinomů slinivky břišní je spojena se sníženou dobou přežití takto postižených pacientů (167). Naopak snížená hladina mRNA pro TβR-I i TβR-II byla nalezena u většiny kolorektálních karcinomů (93). Hladina mRNA pro TGFβ1 i hladina proteinu TGFβ1 byla naopak zvýšena u těchto kolorektálních karcinomů (93).

Farmakologické a experimentální ovlivnění hladiny TGFβ a přenosu signálu TGFβ v buňkách

Jak již bylo výše uvedeno, TGFβ je v počáteční fázi vzniku nádorů účinným inhibitorem tohoto procesu. Chemopreventivní účinky retinoidů a tamoxifenu jsou zřejmě zprostředkovány přes TGFβ. Kyselina retinová (vitamin A) indukuje sekreci a aktivaci TGFβ1 a TGFβ2 v endotheliálních a epitheliálních buňkách horních cest dýchacích, kůže, děložního čípku a prostaty *in vitro* a *in vivo* (168-172). Retinoidy silně snižují opakovaný výskyt primárních nádorů u pacientů s vyléčeným karcinomem nosohltanu (1). Nedávne klinické studie ukázaly, že tamoxifen indukuje produkci TGFβ (173-175). Podávání tamoxifenu ženám v silně rizikové skupině na výskyt karcinomu prsu může zabránit vzniku karcinomu prsu (176-178). Chemoprevence pomocí retinoidů a tamoxifenu tedy souvisí s indukcí TGFβ, i když mechanismus zodpovědný za účinek těchto farmak je zatím nejasný.

U pokročilých nádorů, obvykle již resistantních na účinek TGFβ, je naopak zapotřebí snížit hladinu TGFβ. Jak již bylo výše uvedeno, lze toho docílit vnesením antisense DNA pro TGFβ, která je transkribována v buňkách karcinomu na antisense RNA pro TGFβ a ta potom blokuje syntézu TGFβ. Účinné je i vnesení antisense oligonukleotidů, zvláště modifikovaných pro získání větší stability v buňkách karcinomu. Další metodou je použití protilátek proti TGFβ. Lze též podávat protein dekorin, který váže TGFβ (179,180). Tyto metody jsou zatím používány jen experimentálně.

Hladina funkčního proteinu Smad 4 je většinou silně snížena u karcinomů slinivky břišní a proto transfekce plasmidovou DNA se zabudovaným genem pro Smad 4 za účinným promotorem by mohla způsobit potlačení nádoru. Experimentálně bylo zjištěno (181), že opravdu dochází k supresi nádorů v pokusech, kdy byly takto zpracované lidské buňky adeno-

karcinomu Hs766T injikovány do imunodeficitních nahých myši. Neočekávaně se však zjistilo, že mechanismus účinku zvýšené hladiny Smad4 není v obnovení citlivosti nádoru na účinek TGF β , ale pravděpodobně ve snížené expresi VEGF (vascular endothelial growth factor) a ve zvýšené expresi inhibitoru angiogenese, thrombospondinu 1 (181).

Aplikace antisense DNA nebo antisense oligonukleotidů cílených na inhibici syntézy inhibičního proteinu Smad 7 by mohlo zvýšit přenos signálu TGF β např. u nádorů slinivky břišní, kde protein Smad 7 urychluje růst karcinomu (118). Nedávno bylo ukázáno, že protein Smad 7 asociuje s proteinem Smurf 2, E3 ubikvitinligasou, která se podílí na degradaci proteinu Smad 2 v jádře buněk (182,183). Komplex proteinů Smad 7-Smurf 2 se váže k aktivovanému T β R-I a předurčuje ho k rychlé degradaci proteasomy (182).

Během posledních let se dosáhlo významného pokroku v poznání signální dráhy TGF β . Zároveň byla ukázána důležitost signální dráhy cytokinů rodiny TGF β nejen v procesu vzniku nádorů, ale i v embryonálním vývoji, angiogenese, fibrotických onemocnění ledvin, jater a plic, hojení ran, aterosklerose a selhání ledvin spojeném s diabetem mellitus typu II (3,123, 184-186).

Tento přehledný referát vznikl v rámci řešení výzkumného grantového projektu NC 5535-3 IGA MZ ČR (Genetická analýza kandidátních genů u akutní myeloidní leukemie a myelodysplastického syndromu). Děkuji slečně Olze Kubrové za pomoc s přípravou obrázků a MUDr. J.Jelínkovi,CSc. za přečtení rukopisu a cenné připomínky.

Literatura

- Reis M. TGF- β and cancer. *Microbes Infect* 1999; 1: 1327-1347.
- Kelly DL, Rizzino A. Growth regulatory factors and carcinogenesis: the roles played by transforming growth factor β , its receptors and signaling pathways. *Anticancer Res* 1999; 19: 4791-4808.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358.
- deCaestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor- β signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1388-1402.
- Wieser R. The transforming growth factor- β signaling pathway in tumorigenesis. *Cur Opin Oncol* 2001; 13: 70-77.
- Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factors - β s. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Heidelberg: Springer, 1990; 95: 419-472.
- Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
- Dünker N, Kriegelstein K. Targeted mutations of transforming growth factor- β genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6982-6988.
- Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 2022-2036.
- Böttner M, Kriegelstein K, Unsicker K. The TGF- β s: structure, signaling and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 2000; 75: 2227-2240.
- Gleizes PE, Munger JS, Nunes I et al. TGF- β latency: biological significance and mechanism of action. *Stem Cells* 1997; 15: 190-197.
- Öklü R, Hesketh R. The latent transforming growth factor β binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 2000; 352: 601-610.
- Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Cur Opin Cell Biol* 2000; 12: 634-640.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell* 2000; 93: 1159-1170.
- Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.
- Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 2000; 14: 627-644.
- Tsukazaki, T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* 1998; 95: 779-791.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- Kawabata M, Miyazono K. Signal transduction of the TGF- β superfamily by Smad proteins. *J Biochem* 1999; 125: 9-16.
- Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Cur Opin Cell Biol* 2000; 12: 235-243.
- Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6954-6967.
- Miyazono K. TGF- β signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 15-22.
- Whitman M. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature* 1997; 389: 549-551.
- Xiao Z, Liu X, Henis, YI, Lodish HF. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7853-7858.
- Xiao Z, Liu X, Lodish HF. Importin β mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 2000; 275: 23425-23428.
- Nishita M, Hashimoto M, Ogata S et al. Interaction between Wnt and TGF- β signaling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 2000; 403: 781-785.
- Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99-109.
- Roelink H, Wagenaar E, Lopes da Silva S, Nusse R. Wnt-3, a gene activated by proviral insertion.
- Lee FS, Lane TF, Kuo A, Shackleford GM, Leder P. Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fgf-3 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2268-2272.
- Labbe E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1 / T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8358-8363.
- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998; 12: 599-606.
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 1993; 72: 73-84.
- Brown CE, Lechner T, Howe LA, Workman JL. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 15-19.
- Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE. Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 1997; 89: 341-347.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 1998; 20: 615-626.
- Ng HH, Bird A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 121-126.
- Jacobson S, Pillus L. Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 175-184.
- Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 40-48.
- Redner R, Wang J, Liu J. Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood* 1999; 94: 417-428.
- Yarden R, Brody L. BRCA1 interacts with histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4983-4988.
- Feng X, Zhang Y, Wu R et al. The tumor suppressor Smad 4 / DPC 4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad3 in TGF- β -induced transcriptional activation. *Genes Dev* 1998; 12: 2153-2163.
- Pouponnot C, Jayaraman L, Massagué J. Physical and functional interaction of SMADs and p300 / CBP. *J Biol Chem* 1998; 273: 22865-22868.
- Janknecht R, Wells N, Hunter T. TGF- β - stimulated cooperation of Smad proteins with the coactivators CBP / p300. *Genes Dev* 1998; 12: 2114-2119.
- Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J et al. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with Smads. *J Biol Chem* 1999; 274: 35269-35277.
- Vogel G. A new blocker for the TGF- β pathway. *Science* 1999; 286: 665.
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999; 286: 771-774.
- Luo K, Stroschein S, Wang W et al. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev* 1999; 13: 2196-2206.
- Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12442-12447.
- Xu W, Angelis K, Danielpour D et al. Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type β transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5924-5929.
- Bannister JA, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 1996; 384: 641-643.
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 1996; 87: 953-959.
- Tessier N, Hoang T. Transforming growth factor β inhibits the proliferation of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1988; 72: 159-164.
- Fynan T, Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor- β and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncol* 1993; 4: 493-540.

54. Murohashi I, Endho K, Nishida S et al. Differential effects of TGF- β 1 on normal and leukemic human hematopoietic cell proliferation. *Exp Hematol* 1995; 23: 970-977.
55. Kurokawa M, Mitani K, Imai Y, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H. The t(3;21) fusion product, AML/Evi-1, interacts with Smad 3 and blocks transforming growth factor- β -mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 1998; 92: 4003-4012.
56. Sood R, Talwar Tripathi A, Chakrabarti S, Nucifora G. MDS1/EV11 enhances TGF- β 1 signaling and strengthens its growth-inhibitory effect, but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/EV11, product of the (3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF- β 1. *Leukemia* 1999; 13: 348-357.
57. Nucifora G. The EV11 gene in myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 2022-2031.
58. Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN. Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3- dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 1988; 54: 831-840.
59. Kurokawa M, Ogawa S, Tanaka T, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H. The AML1/Evi-1 fusion protein in the t(3;21) translocation exhibits transforming activity on Rat1 fibroblasts with dependence on the Evi-1 sequence. *Oncogene* 1995; 11: 833-840.
60. Morishita K, Parganas E, Matsugi T, Ihle JN. Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32Dcl3 myeloid cells blocks granulocyte differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 183-189.
61. Tanaka T, Mitani K, Kurokawa M. et al. Dual functions of the AML-1/Evi-1 chimeric protein in the mechanism of leukemogenesis in (3;21) leukemias. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2383-2392.
62. Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, Hirai H. The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor β signaling. *Blood* 2001; 97: 2815-2822.
63. Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia* 1999; 13: 1932-1942.
64. Tashirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H et al. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBF beta. *Cell* 2001; 104: 755-767.
65. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosfeld G, Downing JR. AML-1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal murine fetal hematopoiesis. *Cell* 1996; 84: 321-330.
66. Sasaki T, Yagi H., Brownson RT et al. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12359-12363.
67. Hanai J, Chen LF, Kanno T et al. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads: synergistic induction of the immunoglobulin germ line C β promoter. *J Biol Chem* 2000; 274: 31577-31582.
68. Pardali E, Xie XQ, Tsapogas P et al. Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor β 1 responsiveness to human germ line IgA genes. *J Biol Chem* 2000; 275: 3552-3560.
69. Jakubowski A, Pouponnot C., Beguido F et al. Inhibition of the transforming growth factor β 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 40282-40287.
70. Park K, Kim SJ, Bang YJ et al. Genetic changes in the transforming growth factor β (TGF- β) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8772-8776.
71. Markowitz S, Wang J, Myeroff L et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338.
72. Parsons R, Myeroff LL, Liu B et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5548-5550.
73. Garrigue-Antar L, Munoz AT, Antonia S et al. Missense mutations of the transforming growth factor β type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3982-3987.
74. Knaus PI, Lindemann D, De Coteau JF et al. A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor- β type II receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3480-3489.
75. Lu SL, Zhang WC, Akiyama Y, Nomizu T, Yuasa Y. Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 4595-4598.
76. De Jonge RR, Garrigue-Antar L, Velluci VF, Reiss M. Frequent inactivation of the transforming growth factor beta type II receptor in small cell lung carcinoma cells. *Oncol. Res.* 1997; 9: 89-98.
77. Lynch MA, Nakashima R, Song H et al. Mutational analysis of the transforming growth factor- β receptor type II in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4227-4232.
78. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 5329-5332.
79. Grady W, Myeroff L, Swinler S et al. Mutational inactivation of transforming growth β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 320-324.
80. Yang HK, Kang SH, Kim YS, Won K, Bang YJ, Kim SJ. Truncation of the TGF-beta type II receptor gene results in insensitivity to TGF-beta in human gastric cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 2213-2219.
81. Kim SJ, Im YH, Markowitz SD, Bang YJ. Molecular mechanisms of inactivation of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 159-168.
82. Lu SL, Kawabata M, Imamura T et al. HNPCC associated with germline mutation in the TGF- β type II receptor gene. *Nat Genet* 1998; 19: 17-18.
83. Chen T., de Vries E, Hollema H. et al. Structural alterations of transforming growth factor β receptor genes in cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 82: 43-51.
84. Pasche B, Kolachana P, Nafa K et al. TBR-I (6A) is a candidate tumor susceptibility allele. *Cancer Res* 1999; 59: 5678-5682.
85. Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L, Reiss M. Transforming growth factor β type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 4805-4810.
86. Anbazhagan R, Borman D, Johnston J et al. The S387Y mutations of the transforming growth factor- β receptor type I gene is uncommon in metastases of breast cancer and other common types of adenocarcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 3363-3364.
87. Kim IY, Ahn HJ, Zelner D et al. Genetic change in transforming growth factor β (TGF- β) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF- β 1 in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56: 44-48.
88. Wang D, Kanuma T, Mizunuma H et al. Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor- β signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4507-4512.
89. DeCoteau JF, Knaus PI, Yankelev H et al. Loss of functional cell surface transforming growth factor β (TGF- β) type I receptor correlates with insensitivity to TGF- β in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5877-5881.
90. Guo Y, Jacobs S, Kyprianou N. Down regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor- β (TGF- β) type I and typeII receptors in human prostate cancer. *Int J Cancer* 1997; 71: 573-579.
91. Lazzereschi D, Ranieri A, Mincione G, Taccogna S, Nardi F, Colletta G. Human malignant thyroid tumor displayed reduced levels of transforming growth factor β receptor type II messenger RNA and protein. *Cancer Res* 1997; 57: 2071-2076.
92. Bristow RE, Baldwin RL, Yamada SD, Korc M, Karlan BY. Altered expression of transforming growth factor- β ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 658-668.
93. Matsushita M, Matsuzaki K, Date M et al. Down-regulation of TGF- β receptors in human colorectal cancer: implications for cancer development. *Br J Cancer* 1999; 80: 194-205.
94. Tokunaga H, Lee DH, Kim IY, Wheeler TM, Lerner SP. Decreased expression of transforming growth factor- β receptor type I is associated with poor prognosis in bladder transitional cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2520-2525.
95. Munoz-Antonia T, Li X, Reiss M, Jackson R., Antonia S. A mutation in the transforming growth factor- β type II receptor gene promoter associated with loss of gene expression. *Cancer Res* 1996; 56: 4831-4835.
96. Kang S, Bang Y, Im Y et al. Transcriptional repression of the transforming growth factor- β -type I receptor gene by DNA methylation results in the development of TGF- β resistance in human gastric cancer. *Oncogene* 1999; 18: 7280-7286.
97. Hahn KB, Cho K, Lee C et al. Repression of the gene encoding the TGF- β type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999; 23: 222-227.
98. Hahn SA, Schutte M, Hoque A et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353.
99. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS et al. Evaluation of candidate tumor suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996; 13: 343-346.
100. Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S. Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res* 1997; 57: 2578-2580.
101. Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF- β signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 1998; 4: 257-262.
102. Miyaki M, Iijima T, Konishi M et al. Higher frequency of Smad 4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999; 18: 3098-3103.
103. Wilentz R, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000; 60: 2002-2006.
104. Yanagisawa K, Uchida K, Nagatake M et al. Heterogeneities in the biological and biochemical functions of Smad2 and Smad4 mutants naturally occurring in human lung cancers. *Oncogene* 2000; 19: 2305-2311.
105. Schutte M, Hruban RH, Hedrick L et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 1996; 56: 2527-2530.
106. Takakura S, Okamoto A, Saito M et al. Allelic imbalance in chromosome band 18q21 and SMAD 4 mutations in ovarian cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 264-271.
107. Houlston R, Bevan S, Williams A et al. Mutations in DPC4 (SMAD 4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1907-1912.
108. Howe JR, Roth S, Ringold JC et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998; 280: 1086-1088.
109. Roth S, Sistonen P, Salovaara R et al. SMAD genes in juvenile polyposis. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 54-61.
110. Moskaluk C, Hruban RH, Schutte M et al. Genomic sequencing of DPC4 in the analysis of familial pancreatic carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 85-90.
111. Eppert K, Scherer S, Ozcelik H et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF β - regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-552.
112. Uchida K, Nagatake M, Osada H et al. Somatic in vivo alterations of the JV-18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 5583-5585.

113. Arai T, Akiyama Y, Okabe S et al. Genomic structure of the human Smad 3 gene and its infrequent alterations in colorectal cancers. *Cancer Lett* 1998; 122: 157-163.
114. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. Smad 3 mutant mice develop metastatic colorectal carcinoma. *Cell* 1998; 94: 703-714.
115. Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E et al. Mad-related genes in the human. *Nat Genet* 1996; 13: 347-349.
116. Roijer E, Moren A, ten Dijke P, Stenman G. Assignment of the Smad 7 gene (MADH 7) to human chromosome 18q21.1 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 81: 189-190.
117. Kleeff J, Maruyama H, Friess H, Büchler MW, Falb D, Korc M. Smad 6 uppress TGF-beta-induced growth inhibition in COLO-357 pancreatic cancer cells and is overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 268-273.
118. Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H et al. The TGF- β signaling inhibitor Smad 7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 1999; 18: 5363-5372.
119. Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressor Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor β signaling by targeting Smads to the ubiquitin - proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4820-4825.
120. Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997; 388: 87-93.
121. Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massagué J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 1997; 388: 82-87.
122. Dai JL, Turnacioglu K, Schutte M et al. Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4592-4597.
123. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.
124. Ravitz MJ, Wenner CE. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF- β . *Adv Cancer Res* 1997; 71: 165-207.
125. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-330.
126. Weinberg RA. E2F and cell proliferation: a word turned upside down. *Cell* 1996; 85: 457-459.
127. Shima Y, Nakao K, Nakashima T et al. Activation of caspase-8 in transforming growth factor-beta-induced apoptosis of human hepatoma cells. *Hepatology* 1999; 30: 1215-1222.
128. Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A et al. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor β in fetal hepatocytes. *FASEB J* 2001; 15: 741-751.
129. Cain K, Freathy C. Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol Lett* 2001; 120: 307-315.
130. Teramoto T, Kiss A, Thorgerisson SS. Induction of p53 and Bax during TGF- β 1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 56-60.
131. Yamamoto M, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor β 1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-XL induction. *Hepatology* 1998; 27: 959-966.
132. Guo Y, Kyriakou N. Restoration of transforming growth factor β signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59: 1366-1371.
133. Liao J-H, Zhou B-H, Chai M-Q, Song J-G. Cycloheximide blocks TGF- β 1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 22: 176-182.
134. Francis JM, Heyworth CM, Spooner E, Pierce A, Dexter TM, Whetton AD. Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 39137-39145.
135. Totth A, Sebestyen A, Barna G et al. TGF beta 1 induces caspase-dependent but death-receptor independent apoptosis in lymphoid cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 1207-1212.
136. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 390-397.
137. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
138. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 21-43.
139. Poon RT-P, Fan S-T, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1207-1225.
140. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 6271-6274.
141. Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Biphasic effect of transforming growth factor- β 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* 1993; 204: 356-363.
142. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz Friedman A, Garcia M. Transforming growth factor - β 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1993; 155: 595-605.
143. Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T et al. Excessive production of transforming growth factor- β 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1137: 189-196.
144. Ueki N, Ohkawa T, Yokoyama Y et al. Potentiation of metastatic capacity by transforming growth factor- β 1 gene transfection. *Jpn J Cancer Res* 1992; 84: 589-593.
145. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushira T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 964-971.
146. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta1 knock out mice. *Development* 1995; 121: 1845-1854.
147. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 1996; 179: 297-302.
148. Kehrl JH, Taylor A, Kim SJ, Fauci AS. Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1991; 628: 345-353.
149. Bouchard C, Fridman WH, Sautes C. Mechanism of inhibition of liposaccharide-stimulated mouse B-cell responses by transforming growth factor-beta1. *Immunol Lett* 1994; 40: 105-110.
150. Kulkarni AB, Karlsson S. Inflammation and TGF beta1: lessons from the TGF beta1 null mouse. *Res Immunol* 1997; 148: 453-456.
151. Brandes ME, Allen JB, Ogawa Y, Wahl SM. Transforming growth factor beta1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* 1991; 87: 1108-1113.
152. Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B et al. Studies on the mechanisms by which transforming growth factor-beta (TGF-beta) protects against allergic encephalomyelitis. Antagonism between TGF-beta and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1993; 151: 1116-1127.
153. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kurewilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7375-7379.
154. Chang HL, Gillett N, Figari I, Lopez AR, Palladino MA, Derynck R. Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells. *Cancer Res* 1993; 53: 4391-4398.
155. Letterio JL, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF β . *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161.
156. Beck C, Schreiber H, Rowley DA. Role of TGF- β in immune evasion of cancer. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 387-395.
157. Glick AB, Lee M, Darwiche N, Kulkarni AB, Karlsson S, Yuspa SH. Targeted deletion of the TGF- β 1 gene causes rapid progression in squamous cell carcinoma. *Genes Dev* 1994; 8: 2429-2440.
158. Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T. Transforming growth factor β 1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 1999; 59: 3379-3386.
159. Ananth S, Knebelmann B, Gruning W et al. Transforming growth factor- β 1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 2210-2216.
160. Matthews E, Yang T, Janulis L et al. Down-regulation of TGF- β 1 production restores immunogenicity in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2000; 83: 519-525.
161. Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL et al. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor β antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2909-2914.
162. Park JA, Wang E, Kurt RA, Schluter SF, Hersh EM, Akporiaye ET. Expression of an antisense Transforming Growth Factor-Beta-1 transgene reduces tumorigenicity of EMT6 mammary tumor cells. *Cancer Gene Therapy* 1997; 4: 42-50.
163. Tzai TS, Lin CI, Shiau AL, Wu CL. Antisense oligonucleotide specific for transforming growth factor-beta 1 inhibit both in vitro and in vivo growth of MBT-2 murine bladder cancer. *Anticancer Res* 1998; 18: 1585-1589.
164. Stearns M, Garcia F, Fudge K et al. Role of interleukin 10 and transforming growth factor- β 1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 711-720.
165. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R et al. Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999; 401: 480-485.
166. Degen W, Weterman M, van Groningen J et al. Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. *Int J Cancer* 1996; 65: 460-465.
167. Wagner M, Kleeff J, Friess H, Büchler MW, Korc M. Enhanced expression of the type II transforming growth factor-beta receptor is associated with decreased survival in human pancreatic cancer. *Pancreas* 1999; 19: 370-376.
168. Matsushita M, Matsuzaki K, Date M et al. Down-regulation of TGF- β receptors in human colorectal cancer: implications for cancer development. *Br J Cancer* 1999; 80: 194-205.
169. Glick AB, McCune BK, Abdulkarem N et al. Complex regulation of TGF-beta expression by retinoic acid in the vitamin A-deficient rat. *Development* 1991; 111: 1081-1086.
170. Batova A, Danielpour D, Pirisi L, Creek KE. Retinoic acid induces secretion of latent growth factor beta1 and beta 2 in normal and human papillomavirus type 16-immortalized human keratinocytes. *Cell Growth Differ* 1992; 90: 1379-1385.
171. Kojima S, Rifkin DB. Mechanism of retinoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Physiol* 1993; 155: 323-332.

172. Danielioug D. Induction of transforming growth factor beta secretase activity by all-trans-retinoic acid and 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in NRP-130 rat prostate epithelial cells. *J Cell Physiol* 1998; 180: 231-239.
173. Buzza A, Maclellan K, Flinders KC et al. Induction of transforming factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res* 1992; 52: 4261-4264.
174. Kopp A, Jener W, Schnabel M, Knobbe C. Transforming growth factor beta 2 (TGF-beta 2) levels in plasma of patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen. *Cancer Res* 1995; 55: 4512-4515.
175. Knobbe C, Kopp A, Hilgers W et al. Regulation and role of TGF-beta production in breast cancer. *Ann NY Acad Sci* 1996; 784: 263-274.
176. Dickens TA, Collins AA. The pharmacological manipulation of members of the transforming growth factor beta family in chemoprevention of breast cancer. *Bioessays* 1995; 15: 71-74.
177. Bush TL, Helzlsouer KJ. Tamoxifen for the primary prevention of breast cancer: a review and critique of the concept and trial. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 233-243.
178. Ponder TJ, Jones AL, Ashley SE et al. The Royal Marsden Hospital pilot tamoxifen chemoprevention trial. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 31: 73-82.

179. Bender WA, Noble NA. Targeting growth factor-beta for treatment of cancer. *Nature Med* 1995; 1: 1000-1001.
180. Gao SN, Hyde DM, Brown ER, Gaudin W, Harper JR, Florschuetz MD. Antifibrotic Effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1209-1216.
181. Schwartz-Waldhoff I, Vaipen OV, Brack NP et al. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9624-9628.
182. Karsan F, Rasmussen RK, Cawling CG et al. Smad7 binds to Smad2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 5: 1365-1375.
183. Lin X, Liang M, Peng XH. Smad2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 36819-36822.
184. Bender WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.
185. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
186. Reeves WB, Androsch TL. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7563-7568.