



© Eric Dinyer

Escrit per:

**Roger Gomis i Joan Massagué**

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center  
New York

## ***VIURE SOTA CONTROL: L'INTRIGANT BIOLOGIA DEL FACTOR TGF- $\beta$***

### **Introducció**

Les nostres cèl·lules i teixits es desenvolupen i es mantenen en ordre a base d'emetre i obeir constantment senyals intercel·lulars. Entre els pèptids hormonals segregats per les cèl·lules per a executar aquesta funció reguladora destaca especialment el factor  $\beta$  de transformació del creixement (TGF- $\beta$ ). El TGF- $\beta$  i altres membres de la seva família són responsables del control de molts aspectes fonamentals del comportament cel·lular, incloent la migració, l'adhesió, la proliferació, la diferenciació i la modificació del microambient (Fig. 1).

El TGF- $\beta$  és la citoquina inhibidora del creixement per excel·lència. Tanmateix, la inhibició del creixement és només un dels seus molts efectes. La via de senyalització del TGF- $\beta$  és important en la promoció del creixement i la morfogènesi dels teixits amb un clar paper en processos com la vasculogènesi i l'angiogènesi que es dona en el desenvolupament de l'embrió. No hi ha proves genètiques, procedents d'estudis de l'ablació de gens de la via de senyalització del TGF- $\beta$ , que permetin concloure el paper del TGF- $\beta$  com a inhibidor del creixement en els primers estadis de l'embriogènesi. En canvi, més tard, quan els teixits ja estan formats, molts tipus de cèl·lules adquireixen l'habilitat de respondre a TGF- $\beta$  amb una parada de la divisió cel·lular o amb la mort

programada (apoptosi). Per tant, la naturalesa i les vicissituds de la cèl·lula –més enllà del TGF-β mateix- determinen la resposta final a aquesta citoquina.

La dècada del 90 ens va proporcionar el progressiu descobriment del tronc central de la via de senyalització del TGF-β amb els seus receptors de membrana i els factors de transcripció SMAD (Fig. 2). El TGF-β estimula l'activació de les proteïnes SMAD que s'acumulen al nucli per controlar l'expressió d'un gran nombre de gens diana. Aquests avenços també han fet evident que la diversitat de respostes al TGF-β en els diferents tipus cel·lulars no es genera, en principi, per la utilització de diferents vies de senyalització sinó per la diferent lectura que en fan els diferents tipus de cèl·lules.

L'habilitat de les proteïnes SMADs per regular un determinat gen i la decisió d'activar o reprimir la seva transcripció vénen determinats pels cofactors que confereixen la singularitat de la seva acció als complexos amb SMAD (Fig. 2). Les cèl·lules contenen un assortiment diferent de cofactors d'SMAD – en funció del seu llinatge, estadi del desenvolupament i de la influència del seu entorn- que permeten generar un repertori molt variat de complexos transcripcionals d'SMAD i, per tant, de respostes gèniques. Això permet que la resposta a TGF-β

sigui interpretada de diferents maneres depenent del context cel·lular.

Aquesta visió de com les cèl·lules interpreten els senyals del TGF-β ens guia en la tasca de definir programes transcripcionals específics de la resposta a TGF-β en cada cèl·lula i cada situació. Alhora, aquesta visió ens facilita l'anàlisi del paper del TGF-β en l'oncògenesi, procés en el qual la resposta d'inhibició de la proliferació del TGF-β és sovint substituïda per respostes d'invasió i metastasi.

### Senyalització de la membrana al nucli

El esdeveniments moleculars que condueixen des de l'activació dels receptors de TGF-β en la superfície cel·lular cap a la formació dels complexos transcripcionals d'SMAD i la regulació de tot aquest procés comença a ser entès en la seva totalitat (Fig. 2). Breument: la unió del TGF-β induïx la formació d'un complex serina/treonina cinasa que inclou el receptor tipus I del TGF-β (TBR1) i el receptor tipus II (TBR2). L'activitat cinasa del TBR2 fosforila una regió reguladora del TBR1 coneguda com a domini GS, que comporta l'activació de l'activitat cinasa. Aleshores, el TBR1 reconeix i fosforila de manera regulada, per activació del receptor, les proteïnes SMAD

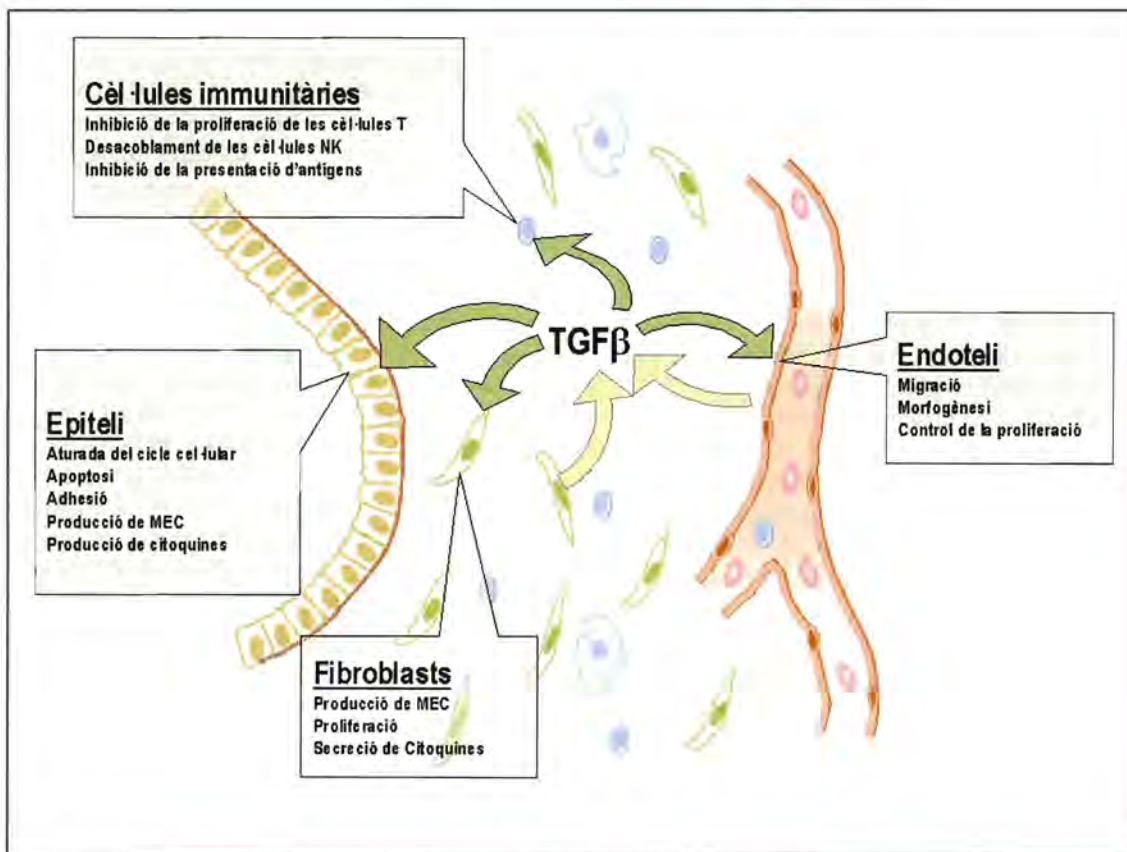
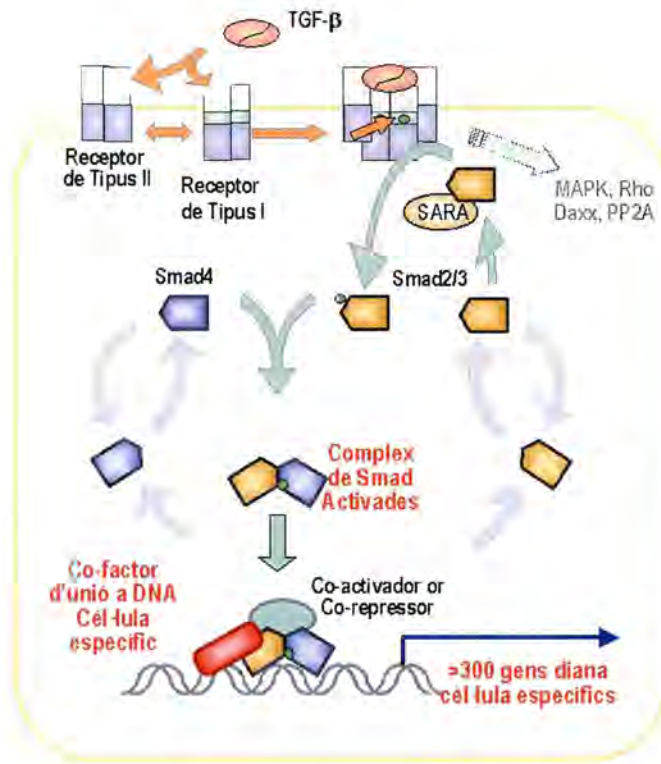


Figura 1. Les dianes del TGF-β i les seves accions en els teixits madurs. El TGF-β ajuda a mantenir l'homeostasi en els teixits a través del control de la proliferació de diversos tipus cel·lulars –incloent-hi les cèl·lules epitelials, endotelials, els fibroblasts de l'estroma i les cèl·lules immunes- així com mitjançant la interacció d'aquestes cèl·lules amb el microambient del seu teixit.





**Figura 2. Diagrama esquemàtic de la via de senyalització del TGF-β.** El TGF-β s'uneix al receptor de tipus II i recluta el receptor de tipus I cap al seu complex. El receptor de tipus II fosforila el receptor de tipus I en el domini GS. El receptor de tipus I activat pot, aleshores, fosforilar les SMADs associades al receptor (SMAD 2/3), permetent la seva alliberació de les proteïnes d'ancoratge, com és ara SARA (*SMAD anchor for receptor activation*). Les SMAD 2/3 fosforilades poden aleshores formar dímers o trímers amb l'SMAD4, translocar al nucli i interaccionar amb ambdós cofactors d'unió al DNA així com amb coactivadors i corepressors, per modular la transcripció dels gens diana del TGF-β. L'entrada i sortida nucleocitoplasmàtica de les proteïnes SMAD també succeeix quan es troben en estat desfosforilat. Les vies de senyalització independents de les SMAD també poden actuar per sota el complex del receptor del TGF-β.

(R-SMADS). El TBRI i els receptors dels factors de la mateixa família, activina i nodal, reconeixen SMAD2 i SMAD3, mentre que els receptors de tipus I de *bone morphogenic protein* (BMP) reconeixen principalment SMAD1, SMAD5 i SMAD8. La fosforilació per part del receptor activat té lloc en les serines de la seqüència Ser-X-Ser present a l'extrem carboxiterminal de tots els R-SMADS.<sup>1</sup>

En estat basal, SMAD2 i SMAD3 es poden unir a diverses proteïnes –incloent-hi SARA (*SMAD anchor for receptor activation*)– i aquestes interaccions retenen les SMADs al citoplasma.<sup>2</sup> La fosforilació pel receptor disminueix l'afinitat d'SMAD per SARA. Alliberades de la unió amb SARA, SMAD2 i SMAD3 formen complexos amb SMAD4 –un cofactor que és essencial per a la formació de complexos transcripcionals (Fig. 2). Les SMAD2, SMAD3, i SMAD4

es desplacen constantment entre el nucli i el citoplasma, independentment del seu estat de fosforilació, per interacció directa amb les nucleoporines del porus nuclear (Fig. 2).<sup>3</sup> Un altre senyal de localització nuclear es troba localitzat en el domini MH1 aminoterminal de l'SMAD3. Encara que s'han dibuixat com heterodímers en la Fig. 2, els heterodímers SMAD2/3-SMAD4 es formen en funció del gen diana.<sup>5-7</sup>

Les proteïnes SMAD només romanen al nucli durant l'estímul de TGF-β. Sembla que aquestes duen a terme repetitívament cicles de desfosforilació, sortida cap al citoplasma, refosforilació i entrada, altra vegada, al nucli (Fig. 2).<sup>15</sup> El complex activat del receptor de TGF-β també pot induir la mobilització d'un complex proteic format per SMAD7-SMURF1 del nucli cap al citoplasma.<sup>16,17</sup> SMAD7 és una SMAD inhibidora i SMURF és un

domini HECT de la ligasa E3 d'ubiquitina. En el citoplasma, aquest complex reconeix el receptor activat i actua com a intermediari de la ubiquitinització i internalització del receptor –via vesícules riques en caveolines– que condueixen a la terminació del senyal de TGF-β.<sup>18</sup> Les proteïnes SMURF també podrien regular el nivell basal de R-SMADS<sup>19</sup> i contribuir a la ubiquitinització i degradació dels R-SMADS activats que han passat a través del nucli.<sup>20</sup>

## Control del genoma

L'anàlisi dels patrons de transcriptòmica ha revelat que l'addició de TGF-β a les cèl·lules comporta la ràpida activació o la repressió de més d'un centenar de gens en un determinat tipus cel·lular.<sup>10,11</sup> Diferents subgrups de respostes gèniques condueixen a diverses respostes cel·lulars a la citoquina (Taula1). En el nucli, els complexos activats d'SMAD poden reconèixer directament els gens diana que contenen diverses còpies de la seqüència de DNA reconeguda per SMAD, CAGAC;<sup>1</sup> tanmateix, la majoria dels elements dels promotors que responen a SMAD contenen una còpia d'aquest motiu, el qual, per ell mateix, té una baixa afinitat a SMADs. Per reconèixer cada uns dels gens diana de forma eficient i selectiva, el complex d'SMAD ha d'incorporar un cofactor amb capacitat d'unió a DNA que reconegui una seqüència propera al promotor diana (Fig. 2). Els primers factors identificats amb aquesta funció de cofactors d'SMAD van ser el membre de la família *Forkhead*, FOXH1 (prèviament conegut com a FAST1) per a SMAD2,<sup>8</sup> i la proteïna OAZ per a SMAD1.<sup>9</sup> Més recentment, membres de diverses famílies de proteïnes d'unió a DNA han estat identificats com a cofactors d'SMAD en la regulació de diferents gens. En funció del cofactor incorporat a cada complex SMAD, el complex reclutarà coactivadors transcripcionals com p300, CBP o SMIF<sup>12</sup> o corepressors com p107,<sup>13</sup> que en definitiva determinaran si el gen diana serà activat o reprimat (Fig. 2). Altres corepressors com SKI, SNON, TGIF, EVI1 i SIP1 atenuen la transactivació per SMAD.<sup>14</sup>



## Variants

La via de senyalització de les SMAD és fonamental per a moltes, però no totes, les respostes gèniques a TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  s'ha vist que pot activar la cinasa regulada per senyals extracel·lulars (ERK) -1, ERK2, p38, la cinasa aminoterminal de c-Jun (JNK) o les proteïnes cinases activades per mitògens (MAPK) en diversos tipus de línies cel·lulars, i això pot succeir ràpidament i de manera independent de les SMADS (Fig. 2).<sup>21,22</sup> Formes mutants de TBRI que són defectives en la capacitat de reconèixer SMAD, però que retenen l'activitat cinasa, encara poden activar p38 i JNK.<sup>23,24</sup> Tot i que la manera exacta per la qual el TGF- $\beta$  activa aquestes cinases resta per aclarir, TAK1, una MAPK cinasa cinasa (MEKK),<sup>25</sup> i una *small GTPasa* com és

ara RHOA<sup>21,26</sup> han estat implicades com a intermediàries en la senyalització. En altres casos, l'activació de p38 o JNK pel TGF- $\beta$  succeeix amb una cinètica retardada.<sup>21</sup> El TGF- $\beta$  induïx l'expressió de GADD45 $\beta$  -un activador de MEKK4 en la cascada de la p38 cinasa- via la senyalització d'SMAD.<sup>27</sup> El complex del receptor de TGF- $\beta$  pot activar també la proteïna fosfatasa PP2A, un regulador negatiu de la proteïna p70 ribosomal S6 cinasa.<sup>28</sup> Les R-SMADS per si mateixes són directament fosforilades per les ERKs com a conseqüència de l'activació de la via de senyalització de RAS. Aquests esdeveniments de fosforilació s'ha vist que poden modificar o inhibir l'activitat de senyalització de SMAD1, SMAD2 i SMAD3.<sup>29,30</sup> Tanmateix, la via de senyalització de RAS pot,

positivament<sup>31,32</sup> o negativament,<sup>33</sup> afectar la via de senyalització de les SMAD a través de mecanismes indirectes. En el cas de BMP, membre de la família del TGF- $\beta$ , s'ha observat que la senyalització induïda pel receptor de tipus II cap al citoesquelet d'actina es produeix directament a través de la LMK1 cinasa.<sup>34</sup> Mitjançant aquests lligams, el centre de la via de transducció del senyal d'SMAD es modula a través d'una complexa xarxa de reguladors positius i negatius que influeixen en la resposta cel·lular del TGF- $\beta$ .

## Control d'epitelis

Nombrosos exemples il·lustren la importància del TGF- $\beta$  com a inhibidor del creixement dels teixits epitelials (Taula 2). Per exemple, el

Taula 1. Exemples de gens de resposta immediata a TGF- $\beta$  que són compartits per les cèl·lules epitelials de la pell, la glàndula mamària i el pulmó.<sup>11000</sup>

Grups Funcionals	Respostes a TGF- $\beta$	Gens
Programa Citostàtic	Inducció	p15Ink4b, p21Cip1
	Repressió	c-myc, Id1, Id2, Id3
Matriu extracel·lular	Inducció	PAI-1, uPA, Col V1-A1, ADAM19, Integrina $\alpha$ 5, integrina $\beta$ 6
Xarxa Paracrina	Inducció	IL-11, VEGF, CTGF, Jagged1, Follistatina 3, Angiopoietina 4
	Repressió	IL-1 $\beta$ , BMP4
Xarxa de senyalització	Inducció	BMPRII, VDR, EphB2, RhoGEF114, MEKK4
	Repressió	LDLR, PGE-R4, $\beta$ AR-2
Xarxa transcripcional	Inducció	Ets2, c-Jun, JunB, ATF3, Gadd45 $\beta$ , Pim1, Mad2, Mad4
	Repressió	C/EBP $\delta$ , MRG1, TRIP-Br2
Altres respostes	Inducció	T-box3, MN1, Ig $\lambda$ , Syalyl transferasa 4A
	Repressió	Sprouty2, IAP3, UDPG-ceramida GT
Feedback negatiu	Inducció	Smurf1, Smurf2, Smad7, SnoN

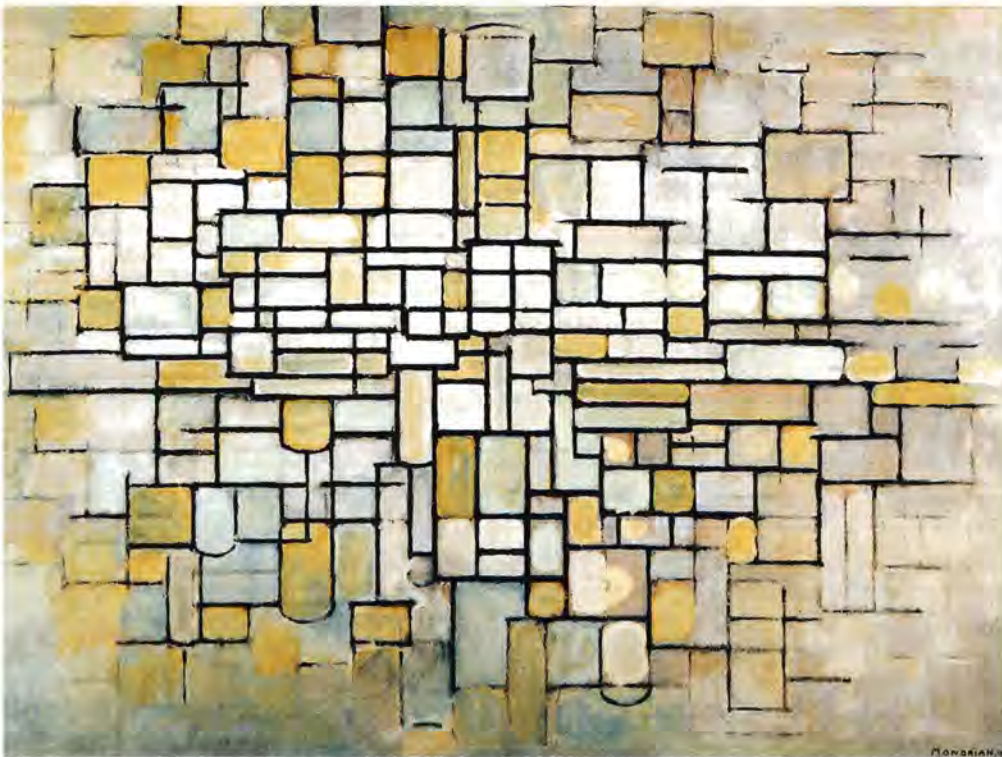
Les respostes gèniques estan subdividides en grups funcionals i d'aquests s'indica quins són induïts i quins són reprimits pel TGF- $\beta$ . Només algunes d'aquestes respostes gèniques es troben específicament dedicades a dur a terme la resposta citostàtica en aquestes cèl·lules. D'altres respostes gèniques participen en la regulació de la interacció de la cèl·lula amb l'ambient, tant controlant la producció de citoquines, com la de components de la matriu extracel·lular, o bé modificant les xarxes de senyalització i els reguladors transcripcionals que perceben el procés de senyals externs, incloent-hi el mateix senyal de TGF- $\beta$ .



desenvolupament, expansió i involució dels epitelis de la glàndula mamària són processos altament influenciats pel TGF- $\beta$ . La glàndula mamària verge es compon d'una xarxa ductal ramificada que s'expandeix i es diferencia durant el període d'embaràs i lactància. Durant la involució, la regressió de la glàndula mamària es produeix per la mort cel·lular per apoptosi i la remodelació dels teixits per retornar la glàndula mamària al seu estat basal. Nombrosos estudis en animals transgènics ens han mostrat com l'alteració de la senyalització del

la citoquina (Taula 2). Per exemple, la sobreexpressió transgènica del TGF- $\beta$  en les capes diferenciades suprabasals de l'epidermis resulta en un increment del grau de mitosis,<sup>37</sup> mentre que la seva expressió en la capa proliferativa basal causa una inhibició del creixement.<sup>38,39</sup> El TGF- $\beta$  també afecta la cicatrització de les ferides i la formació del teixit de cicatrització en limitar la proliferació dels queratinòcits als marges de la lesió i estimular l'acumulació de col·lagen intersticial.<sup>40</sup>

reconcilien el perquè el TGF- $\beta$  és capaç d'exercir aquestes dues respostes oposades. Les cèl·lules epitelials expressen dos receptors de TGF- $\beta$  de tipus I –ALK1 i ALK5 (TBRI).<sup>46</sup> Els receptors ALK1 via senyalització a través d'SMAD1 incrementen la proliferació i la migració de les cèl·lules epitelials, mentre que els receptors ALK5 via la senyalització a través d'SMAD2/3 suprimeixen aquestes activitats. Aquests dos efectes succeeixen a diferents concentracions de TGF- $\beta$ , de tal manera que aporten una possible base per a una resposta diferencial, dependent dels nivells de TGF- $\beta$ .<sup>45-47</sup>



Compositie in lijn en kleur (1913). Piet Mondrian.

TGF- $\beta$  té influència en molts estadis del desenvolupament, incloent la glàndula mamària verge, en estat d'embaràs i en la seva regressió a través d'efectes en tots dos, l'epiteli i l'estroma (Taula 2).

La pell representa un altre teixit que és altament sensible a l'acció del TGF- $\beta$ . Estudis en animals transgènics revelen efectes contradictoris del TGF- $\beta$  sobre la proliferació o l'apoptosi dels queratinòcits, els quals poden ser un reflex del grau de diferenciació de les cèl·lules epitelials, dels nivells d'expressió del TGF- $\beta$  o de la duració del senyal de

### Control d'endotelis i sistema immune

L'acció del TGF- $\beta$  també controla el creixement dels teixits endotelial, immune i neuronal (Taula 3). Encara que el TGF- $\beta$  induïx la inhibició de la proliferació i l'apoptosi de les cèl·lules endotelials en cultiu (Taula 3), l'acció del TGF- $\beta$  és necessària per la vasculogènesi i l'angiogènesi durant el desenvolupament,<sup>41-43</sup> i la injecció de TGF- $\beta$  *in vivo* genera una resposta angiogènica.<sup>44,45</sup> Estudis recents

L'observació que tots els ratolins *Tgf $\beta$ <sup>-/-</sup>* nous moren al cap de poc temps després del naixement a causa d'una severa resposta inflammatòria que afecta diversos òrgans, mostra el paper essencial del TGF- $\beta$  en el manteniment de l'homeostasi immune.<sup>35,36</sup> La immunitat per les cèl·lules T és particularment important en els fenotips inflamatoris observats en els ratolins *Tgf $\beta$ <sup>-/-</sup>*.<sup>48-50</sup> Experiments en animals transgènics ens han aportat importants proves sobre l'efecte inhibitor del creixement del TGF- $\beta$  sobre els limfòcits T (Taula 3). El TGF- $\beta$  regula la funció de les cèl·lules T a través de diversos mecanismes, incloent-hi la prevenció de la producció d'interleucina 2 (IL-2) i la subsegüent activació de les cèl·lules T, la inducció de l'apoptosi de les cèl·lules T perifèriques,<sup>52</sup> i la inhibició dels limfòcits T citotòxics (CTL), i la diferenciació dels limfòcits T col·laboradors 1 (T<sub>H</sub>1) i limfòcits T col·laboradors 2 (T<sub>H</sub>2).<sup>53-54</sup> La immunosupressió de les cèl·lules T per TGF- $\beta$  té una especial rellevància durant la progressió dels tumors, ja que es pensa que el TGF- $\beta$  produït pel tumor és capaç d'evitar el reconeixement i l'eliminació del tumor per part de les CTLs.

### El programa citostàtic del TGF- $\beta$ : afluïxar el gas i pitjar el fre.

Gran part del nostre coneixement sobre els mecanismes específics que duen a terme els efectes citostàtics del TGF- $\beta$  ve dels estudis en cèl·lules epitelials. Ara bé, moltes d'aquestes observacions han estat també confirmades en altres tipus



Taula 2. Control de la proliferació per part del TGF- $\beta$  en sistemes epitelials

Teixit	Manipulació experimental	Sistema experimental	Efectes
Glàndula Mamària	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 1	Ratolí transgènic (promotors MMTV i WAP)	Hiperplàsia de la glàndula mamària verge i disminució del desenvolupament lobuloalveolar durant l'embaràs.
	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 3	Ratolí transgènic (promotor $\beta$ -lactoglobulina)	Elevada apoptosi durant la involució
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Ratolí transgènic (promotor MMTV)	Increment de la ramificació lateral, hiperplàsia, augment de la sensibilitat a carcinògens
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Ratolí transgènic (promotor tipus metal·lotioneïna)	Increment de la ramificació lateral
	Sobreexpressió del T $\beta$ RI activat	Ratolí transgènic (promotor MMTV)	disminució del desenvolupament lobuloalveolar durant l'embaràs
Pell	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 1	Ratolí transgènic –epidermis basal (agut) (Sistema Loricin/TK) (Keratin5/rTA i rTA)	Disminució de la proliferació dels queratinòcits.
	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 1	Ratolí transgènic –epidermis basal (crònic) (Sistema Loricin/TK) (Keratin5/rTA i rTA)	Fibrosi, hiperplàsia /apoptosi dels queratinòcits
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Ratolí transgènic –epidermis basal (promotor de Loricin)	Alliberament de la inhibició de la proliferació mitjançada pel TGF- $\beta$ .
	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 1	Ratolí transgènic –epidermis suprabasal (promotor de Keratin 10)	Potenciació de la proliferació dels queratinòcits
	Pèrdua homozigòtica de Smad3	In vivo i cultiu primari de queratinòcits	Cicatrització accelerada <i>in vitro</i> i resistència a l'aturada de la proliferació mitjançada pel TGF- $\beta$ en els queratinòcits Smad3-/-
Còlon	Estimulació de TGF- $\beta$ exògena	Cèl·lula epitelial intestinal ( <i>in vitro</i> )	Aturada de la proliferació
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Ratolí transgènic –cèl·lules d'epiteli intestinal primàries (promotor de LFAB)	Reducció de l'aturada de la proliferació mitjançada pel TGF- $\beta$ , però no hi ha prova de la formació de focs criptics ni de potenciació de la proliferació <i>in vivo</i>
Pàncrees	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 1	Ratolí transgènic –cèl·lules $\beta$ dels illots (promotor d'insulina)	Ateració del desenvolupament de les cèl·lules dels illots i supressió de la proliferació de les cèl·lules acinats.
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Ratolí transgènic –cèl·lules acinats (promotor de metal·lotioneïna)	Increment de la proliferació i alteració de la diferenciació
Fetge	Sobreexpressió del TGF- $\beta$ 1	Ratolí transgènic -hepatòcit (promotor d'albumina)	Fibrosi i increment de l'apoptosi, reducció de la resposta proliferativa durant la regeneració del fetge després d'una hepatectomia induïda.
Pròstata	Injecció de TGF- $\beta$ 1 <i>in vivo</i>	Pròstata ventral	Increment de l'apoptosi
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Ratolí transgènic –pròstata ventral (promotor de C3(1))	Disminució de l'apoptosi en epitel·li del ducte proximal

cel·lulars. En cèl·lules normals, els efectes citostàtics normalment són dominants sobre d'altres senyals mitogènics de signe oposat, tot i que en cèl·lules canceroses la potent acció mitogènica de certs oncògens pot sobreposar-se a la capacitat antimitogènica del senyal del TGF- $\beta$ .

El TGF- $\beta$  pot activar la resposta dels gens citostàtics en qualsevol punt de les

transcriptòmics utilitzant microxips han revelat un programa citostàtic compartit per cèl·lules de pell, de mama i de pulmó que inclou l'activació dels inhibidors de cinases del cycle cel·lular (cinases CDK) i la repressió dels factors de transcripció responsables de la promoció de la proliferació *c-MYC*, *ID1*, *ID2* i *ID3*.<sup>11</sup> Diversos lligams a través de retroinhibició serveixen per integrar

La família d'inhibidors CIP/KIP s'uneix i inactiva aquests complexos ciclina-CDK. Els membres d'aquesta família -WAF1, KIP1 (també coneguda com a p27) i KIP2 (també coneguda com a p57)- s'uneixen a la subunitat formada per la ciclina i ho aprofiten per introduir una extensió dins del centre catalític de la CDK, inhibint l'activitat cinasa. Tot i que en el cas dels complexos KIP1-

Taula 3. Control de la proliferació pel TGF- $\beta$  en sistemes de cèl·lules epitelials

Tipus cel·lular	Manipulació Experimental	Sistema Experimental	Efectes
<b>Endotelial</b>	Estimulació del TGF- $\beta$ exògena	Cèl·lules endotelials de capil·lar glomerular ( <i>in vitro</i> )	Inhibició de la proliferació, inducció de l'apoptosi
	Estimulació del TGF- $\beta$ exògena	Vena umbilical humana, cèl·lules endotelials de capil·lar boví ( <i>in vitro</i> )	inducció de l'apoptosi
	Expressió d'ALK1 activat	Cèl·lules endotelials d'embrió de ratolí ( <i>in vitro</i> )	Inducció de la migració, Increment de la proliferació
	Expressió d'ALK5 activat	Cèl·lules endotelials d'embrió de ratolí ( <i>in vitro</i> )	Disminució de la migració, reducció de la proliferació
<b>Immune</b>	Eliminació dirigida del TGF- $\beta$ 1	Knock-out constituït en ratolí ( <i>in vivo</i> )	Mort poc després del naixement a causa d'una severa resposta inflamatòria
	Eliminació dirigida del T $\beta$ RII	Knock-out condicional en ratolí ( <i>in vivo</i> )	Malaltia inflamatòria letal
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Transgènic expressat en cèl·lules T CD4+ i CD8+ ( <i>in vivo</i> )	Activació espontània de les cèl·lules T i desenvolupament d'una malaltia inflamatòria autoimmune.
	Sobreexpressió del DN-T $\beta$ RII	Transgènic expressat en cèl·lules T CD8+ ( <i>in vivo</i> )	Desordres limfoproliferatius
	Sobreexpressió de l'Smad7	Transgènic expressat en cèl·lules T perifèriques ( <i>in vivo</i> )	Inflamació induïda per antigens de les vies respiratòries.
	Eliminació dirigida de l'Smad3	Cèl·lules T Smad3 -/- de melsa ( <i>in vitro</i> )	Resistència a la inhibició de la proliferació mitjançada pel TGF- $\beta$
<b>Neuronal</b>	Estimulació del TGF- $\beta$ exògena	Astròcits primaris de rata ( <i>in vitro</i> )	Disminució de la proliferació
	Eliminació dirigida de l'Smad3	Astròcits primaris de rata Smad3 -/- ( <i>in vitro</i> )	Resistència a la inhibició de la proliferació mitjançada pel TGF- $\beta$

fases del cycle cel·lular com és ara G<sub>1</sub>, S o G<sub>2</sub>. Ara bé, pel fet que els gens que responen al TGF- $\beta$  tenen com a principal diana esdeveniments de la fase G<sub>1</sub>,<sup>55</sup> la incubació amb TGF- $\beta$  de cèl·lules en ple cycle cel·lular que ja han superat el punt de restricció no impedirà que es compleixi aquell cycle que ja hagi estat iniciat.

Recentment ha sorgit la primera visió coherent de com el TGF- $\beta$  orquestra i dirigeix el programa de resposta citostàtica en cèl·lules epitelials. Estudis

aquest programa, facilitant així un estricte control i assegurant una robusta resposta contra la competència de senyals mitogènics (Fig. 3).

*Pitjar el fre: Acumulació dels inhibidors de CDK.* Les cinases CDK2, CDK4 i CDK6 dirigeixen la progressió a través de la fase G<sub>1</sub> del cycle cel·lular, i la seva mala regulació és un esdeveniment freqüent en molts tipus de càncer. En G<sub>1</sub>, l'activació de la CDK4/6 requereix l'associació amb ciclins de tipus D, mentre que la unió a ciclina E facilita l'activació de CDK2.

CDK-ciclina D no sempre s'assoleixi la conformació inhibidora i els complexos puguin restar catalíticament actius, serveixen com a reservori de KIP1.<sup>56</sup> La família de proteïnes INK4 inhibeix específicament CDK4 i CDK6 per contacte directe amb aquestes cinases distorsionant els seus centres catalítics i inhibint la unió de les ciclins.

El TGF- $\beta$  induïx en cèl·lules epitelials l'expressió *CDKN2B* (que codifica per INK4B, també conegut com a p15)<sup>58,59</sup> i *CDKN1A* (el qual codifica

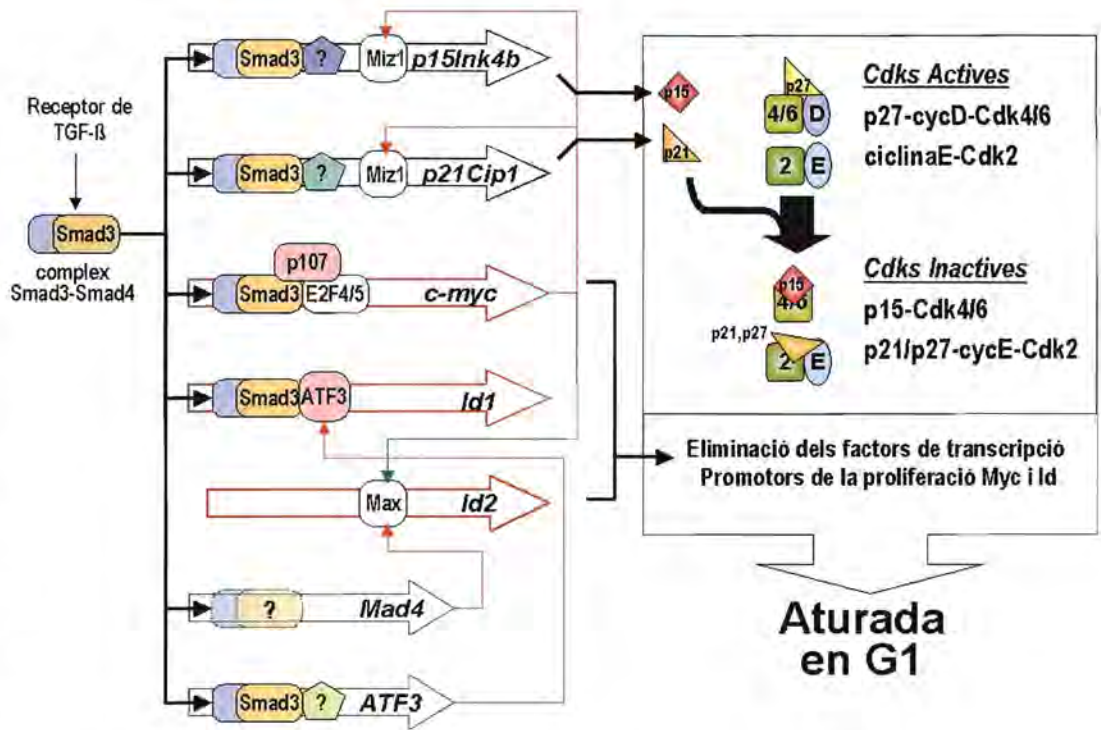


per WAF1, també conegut com a CIP1 i p21).<sup>57,58</sup> En cèl·lules en proliferació, la proteïna c-MYC unida a través de la proteïna MIZ1 als promotors de *CDKN2B* i *CDKN1A*, reprimeix aquests gens.<sup>60-62</sup> La disminució de l'expressió de c-MYC en resposta a TGF-β allibera de la inhibició aquests dos gens, mentre que complexos d'SMAD3 i SMAD4 activats per TGF-β –en associació amb cofactors d'unió a DNA que estem identificant en el moment present– s'uneixen als mateixos promotors tot causant l'activació de la transcripció.<sup>61,62,63</sup> L'associació d'INK4B amb els complexos KIP1-ciclina-D-CDK4/6 força la redistribució de KIP1 des d'aquest complex actiu cap als complexos ciclina-E-CDK2 tot causant la inhibició de CDK2.<sup>64,65</sup> Per tant, el mecanisme d'activació de *CDKN2B* i *CDKN1A* pel TGF-β implica una combinació de l'activació i de l'eliminació de la repressió transcripcionals.

#### Afluixar el gas: repressió de Myc i Id

L'acció del TGF-β disminueix ràpidament l'expressió del regulador transcripcional c-MYC.<sup>66</sup> El responsable d'aquesta disminució de l'expressió de c-MYC és un complex d'SMAD3 i SMAD4 amb E2F4/5 i el repressor transcripcional p107.<sup>13</sup> La disminució de l'expressió de c-MYC per part del TGF-β té dos propòsits –disminuir les funcions que potencien la proliferació i facilitar la inducció de *CDKN2B* i *CDKN1A*– i, per tant, té un paper integrador en el programa citostàtic del TGF-β.

A més a més de la disminució de l'expressió de c-MYC, el TGF-β pot disminuir l'expressió d'*ID1*, *ID2* i *ID3*.<sup>11</sup> Les proteïnes de la família ID són factors de transcripció del tipus hèlix-gir-hèlix bàsic (bHLH) que funcionen com a reguladors negatius i que són crucials per



**Figura 3.** Les respostes gèniques del programa citostàtic del TGF-β compartides per les cèl·lules de la pell, el pulmó i l'epiteli de la glàndula mamària. La senyalització causada per TGF-β induïx l'expressió dels inhibidors dependents de cinases *CDKN2B* (que codifica per *INK4B*) i *CDKN1A* (que codifica per *WAF1*), i reprimeix l'expressió dels factors de transcripció responsables de promoure el creixement com són c-MYC, l'inhibidor d'unió a DNA *ID1* i *ID2*. La regulació de c-MYC integra moltes d'aquestes respostes gèniques mitjançades pel TGF-β, actuant com a inhibidor de *CDKN2B* i *CDKN1A* en associació amb la proteïna d'interacció amb MYC que conté un motiu de dits de zinc (MIZ), i com a inductor d'*ID2* en associació amb MAX. Els complexos SMAD3-SMAD4 activats pel TGF-β tenen gens específics com a diana i fan de mitjancers en l'activació o repressió transcripcional, en funció de la seva associació amb determinats cofactors. La repressió d'*ID1* és dependent d'SMADS i de la formació d'un complex que conté el factor activador de la transcripció 3 (ATF-3), el qual per si mateix és un gen diana de les SMAD. La repressió d'*ID2* és una resposta gènica secundària que pot ser el resultat de la disminució de l'expressió de c-MYC, o bé de l'increment de l'expressió del seu antagonista MAD4. La disminució de MYC i dels factors ID deixa la cèl·lula òrfena de les seves funcions de promoció de la proliferació, mentre que la inducció d'INK4B i WAF1 condueix a la inactivació de les CDKs de la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular.

a la diferenciació cel·lular.<sup>67,68</sup> Per tal de disminuir l'expressió d'*ID1*, l'estimulació amb TGF-β provoca una ràpida inducció del factor de transcripció activador del factor de transcripció activador 3 (ATF-3) a través d'un complex transcripcional que inclou SMAD3.<sup>11</sup> Aquest ATF-3 pot aleshores associar-se a SMAD3 i SMAD4 i formar un complex capaç de reprimir transcripcionalment *ID1*. Els senyals d'estrès, entre els quals podem incloure el TNF-α, també poden induir ATF-3 via p38 MAPK, i per tant lligar aquests senyals amb la via de senyalització d'SMADS en el control de l'expressió d'*ID1*.<sup>11</sup> S'ha demostrat la unió de c-MYC als motius tipus E-BOX en el promotor d'*ID2*<sup>68</sup> que n'estimula la seva expressió, de tal manera que s'ha establert un lligam entre c-MYC i l'expressió d'*ID2*. En conseqüència, la disminució de c-MYC per part del TGF-β pot, de manera secundària, portar a una inhibició d'*ID2* en certs

tipus cel·lulars. A més, el TGF-β induïx l'expressió de MXI1/MAD2 i MAD4, les quals competeixen per MAX –una de les proteïnes associades a c-MYC– i reprimeix la transcripció.<sup>69</sup>

#### Perspectives: el TGF-β en el càncer.

S'han produït molts avenços en el coneixement de com les cèl·lules interpreten els senyals del TGF-β i els transformen en respostes concretes que determinen la funció dels nostres teixits i òrgans. Aquests avenços han permès la comprensió dels mecanismes que són responsables de la resposta d'inhibició del creixement. Així i tot, encara queda molta feina per fer per tal d'assolir un coneixement suficient dels programes citostàtic i apoptòtic en els tipus cel·lulars que són d'interès. Endemès, el coneixement dels mecanismes



responsables d'aquestes respostes gèniques permetrà, sens dubte, revelar les connexions entre la via del TGF- $\beta$  i d'altres vies de la xarxa de senyalització de la cèl·lula. Aquest coneixement ja està contribuint a explicar com determinats senyals oncogènics són capaços d'atenuar les funcions de supressió de tumors del TGF- $\beta$  i transformen aquesta citoquina en un estímul de progressió tumoral. Els estudis amb models animals i mostres clíniques, permetran, en última instància, validar la rellevància d'aquests mecanismes en el càncer.



**Roger Gomis** és doctor en Biologia i forma part del grup de recerca dirigit per Joan Massagué al Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nova York. Ha realitzat la tesi doctoral al departament de Bioquímica i Biologia Molecular al grup d'Enginyeria Metabòlica i Teràpia Gènica de la Diabetis de la Universitat de Barcelona, estudiant les alteracions en el metabolisme de carbohidrats en la diabetis i l'estructura i funció d'enzims del metabolisme del glicogen.



**Joan Massagué** ha estat director del Programa de Biologia Cel·lular durant 14 anys al Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, on dirigirà el nou Programa de Genètica i Biologia del Càncer, l'objectiu del qual és fer una recerca que combini els aspectes bàsics amb els clínics pel que fa a la gènesi, progressió, prognosi, prevenció i tractament del càncer. És també professor a la Cornell University Graduate School of Medical Sciences i investigador del Howard Hughes Medical Institute, a Nova York, activitats que combina amb la presidència del comitè assessor del Parc Científic de Barcelona. Els seus treballs sobre el control del creixement i la mort cel·lular pels factors de creixement de la família del TGF- $\beta$  són reconeguts a nivell internacional. Ha publicat uns dos-cents articles, dels quals quaranta-dos en revistes de màxim prestigi com Cell, Nature i Science que l'han convertit en el segon investigador més citat en el món de la biologia.



*The Ancient of Days* (1794). William Blake.



## Referències

1. Shi, Y. & Massagué, J. (2003) Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
2. Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. & Wrana, J. L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- $\beta$  receptor. *Cell* 95: 779-91.
3. Xu, L., Kang, Y., Col, S. & Massagué, J. (2002) Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF- $\beta$  signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell* 10: 271-82.
4. Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I. & Lodish, H. F. (2000) A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 7853-8.
5. Wu, J. W., Fairman, R., Penry, J. & Shi, Y. (2001) Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. *J. Biol. Chem.* 276: 20688-94.
6. Wu, J. W. et al. (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Mol. Cell* 8: 1277-89.
7. Inman, G. J. & Hill, C. S. (2002) Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J. Biol. Chem.* 277: 51008-16.
8. Chen, X., Rubock, M. J. & Whitman, M. (1996) A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- $\beta$  signaling. *Nature* 383: 691-6.
9. Hata, A. et al. (2000) OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100: 229-40.
10. Zavadil, J. et al. (2001) Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 6686-91.
11. Kang, Y., Chen, C. R. & Massagué, J. (2003) A self-enabling TGF- $\beta$  response coupled to stress signaling. Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* 11: 915-26.
12. Massagué, J. & Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *Embo. J.* 19: 1745-54.
13. Chen, C. R., Kang, Y., Siegel, P. M. & Massagué, J. (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF- $\beta$  receptor to c-myc repression. *Cell* 110: 19-32.
14. Ten Dijke, P., Goumans, M. J., Itoh, F. & Itoh, S. (2002) Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J. Cell. Physiol.* 191: 1-16.
15. Inman, G. J., Nicolas, F. J. & Hill, C. S. (2002) Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- $\beta$  receptor activity. *Mol. Cell.* 10: 283-94.
16. Ebisawa, T. et al. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol. Chem.* 276: 12477-80.
17. Tajima, Y. et al. (2003) Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J. Biol. Chem.* 278: 10716-21.
18. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. & Wrana, J. L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF- $\beta$  receptor signalling and turnover. *Nat. Cell. Biol.* 5: 410-21.
19. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. & Thomsen, G. H. (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687-93.
20. Lo, R. S. & Massagué, J. (1999) Ubiquitin-dependent degradation of TGF- $\beta$ -activated smad2. *Nat. Cell Biol.* 1: 472-8.
21. Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. & Moses, H. L. (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- $\beta$ -mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 274: 37413-20.
22. Hocevar, B. A., Brown, T. L. & Howe, P. H. (1999) TGF- $\beta$  induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo. J.* 18: 1345-56.
23. Yu, L., Hebert, M. C. & Zhang, Y. E. (2002) TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses. *Embo. J.* 21: 3749-59.
24. Itoh, S. et al. (2003) Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor- $\beta$  type I receptor-induced responses. *J. Biol. Chem.* 278: 3751-61.
25. Yamaguchi, K. et al. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- $\beta$  signal transduction. *Science* 270: 2008-11.
26. Bhowmick, N. A. et al. (2001) Transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* 12: 27-36.
27. Takekawa, M. et al. (2002) Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- $\beta$ . *Embo. J* 21: 6473-82.
28. Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A. & Oft, M. (2000) TGF- $\beta$  inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest. *Genes Dev.* 14: 3093-101.
29. Kretschmar, M., Doody, J. & Massagué, J. (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- $\beta$  family mediator Smad1. *Nature* 389: 618-22.
30. Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. (1999) A mechanism of repression of TGF- $\beta$ / Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13: 804-16.
31. Lehmann, K. et al. (2000) Raf induces TGF- $\beta$  production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* 14: 2610-22.
32. Janda, E. et al. (2002) Ras and TGF- $\beta$  cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156: 299-313.
33. Saha, D., Datta, P. K. & Beauchamp, R. D. (2001) Oncogenic ras represses transforming growth factor- $\beta$  /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. *J. Biol. Chem.* 276: 29531-7.
34. Foletta, V. C. et al. (2003) Direct signaling by the BMP Type II Receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell. Biol.* 16: 1089-98.
35. Shull, M. M. et al. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$  1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-9.
36. Kulkarni, A. B. et al. (1993) Transforming growth factor b 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90: 770-4.
37. Cui, W. et al. (1995) Concerted action of TGF- $\beta$ 1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev.* 9: 945-55.
38. Wang, X. J., Liefer, K. M., Tsai, S., O'Malley, B. W. & Roop, D. R. (1999) Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor b1 in the epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 8483-8.
39. Liu, X. et al. (2001) Conditional epidermal expression of TGF- $\beta$  1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 9139-44.
40. Wang, X. J. (2001) Role of TGF- $\beta$  signaling in skin carcinogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 52: 420-9.



41. Dickson, M. C. et al. (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-54.
42. Oshima, M., Oshima, H. & Taketo, M. M. (1996) TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 179: 297-302.
43. Larsson, J. et al. (2001) Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo. J.* 20: 1663-73.
44. Roberts, A. B. et al. (1986) Transforming growth factor type b: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83: 4167-71.
45. Yang, E. Y. & Moses, H. L. (1990) Transforming growth factor b 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell. Biol.* 111: 731-41.
46. Oh, S. P. et al. (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 2626-31.
47. Goumans, M. J. et al. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J* 21, 1743-53.
48. Diebold, R. J. et al. (1995) Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor b1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 12215-9.
49. Letterio, J. J. et al. (1996) Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J. Clin. Invest.* 98: 2109-19.
50. Kobayashi, S. et al. (1999) beta<sub>2</sub>-microglobulin-deficient background ameliorates lethal phenotype of the TGF-beta1 null mouse. *J. Immunol.* 163: 4013-9.
51. Brabletz, T. et al. (1993) Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol. Cell Biol.* 13: 1155-62.
52. Silleu, H. K., Cruickshank, S. M., Southgate, J. & Trejdosiewicz, L. K. (2001) Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. *Immunology* 102: 310-6.
53. Gorelik, L. & Flavell, R. A. (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 46-53.
54. Tzachanis, D. et al. (2001) Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat. Immunol.* 2: 1174-82.
55. Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. & Massagué, J. (1990) Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62: 175-85.
56. Blain, S. W., Montalvo, E. & Massagué, J. (1997) Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J. Biol. Chem.* 272: 25863-72.
57. Datto, M. B. et al. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 5545-9.
58. Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. & Massagué, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9: 1831-45.
59. Hannon, G. J. & Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-61.
60. Staller, P. et al. (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat. Cell Biol.* 3: 392-9.
61. Seoane, J. et al. (2001) TGF-beta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat. Cell Biol.* 3: 400-8.
62. Seoane, J., Le, H. V. & Massagué, J. (2002) Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419: 729-34.
63. Feng, X. H., Lin, X. & Derynck, R. (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15Ink4B transcription in response to TGF-beta. *Embo. J.* 19: 5178-93.
64. Polyak, K. et al. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66.
65. Reynisdottir, I. & Massagué, J. (1997) The subcellular locations of p15Ink4b and p27Kip1 coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* 11: 492-503.
66. Alexandrow, M. G. & Moses, H. L. (1995) Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res.* 55: 1452-7.
67. Norton, J. D. (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell. Sci.* 113 ( Pt 22): 3897-905.
68. Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. & Iavarone, A. (2000) Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407: 592-8.
69. Siegel, P. M., Shu, W. & Massagué, J. (2003) Mad upregulation and Id2 repression accompany TGF-beta mediated epithelial cell growth suppression. *J. Biol. Chem.* 278: 35444-50.