

III. TGF- β : receptores, señales y acciones

Fernando López-Casillas,* Joan Massagué**

Introducción

El Transforming Growth Factor tipo beta, o simplemente TGF- β , es un factor de crecimiento involucrado en el control de la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la reparación tisular y la respuesta inmune.^{1,2} Son tantas y tan diversas las acciones del TGF- β , que no es sorprendente encontrar que defectos en su fisiología normal pueden llevar a enfermedades de muy diversa naturaleza.^{3,4} Lo que sí sorprende es que todas las acciones del TGF- β estén mediadas por un mecanismo de transducción tan elegantemente sencillo,⁵⁻⁸ (Figura 1). En los últimos años el conocimiento de este mecanismo ha permitido poner nombres y apellidos a las moléculas que dan sustento material al nebuloso concepto del "contexto celular", muchas veces invocado para ocultar nuestra ignorancia sobre cómo es que las células responden al TGF- β . También ha permitido proponer mecanismos fisiopatológicos para una pléyade de enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer, haciendo factible el eventual desarrollo de tratamientos racionales y efectivos.

La generación de la señal: los receptores

El TGF- β es un factor polipeptídico dimérico que se une con alta afinidad a diversas proteínas membranales. Sin embargo, sólo dos de ellas, el receptor tipo I y el tipo II, son indispensables para transmitir al interior celular la señal del TGF- β , de ahí que se les considera como los auténticos "receptores de señalamiento". Otras dos glicoproteínas transmembranales, el betaglicano y la endogлина, se consideran "co-receptores" del TGF- β , pues aunque no son requeridas para la generación de su señal, son capaces de modularla al controlar la interacción del factor con los receptores de señalamiento.⁹

Los receptores tipo I y II del TGF- β son proteínas con un pase transmembranal cuyas porciones extracelulares unen al factor y sus regiones intracelulares son cinasas de proteínas que fosforilan residuos serina y treonina. Esta especificidad es una de las diferencias notables con respecto a los receptores de factores mitogénicos como el EGF (Epidermal Growth Factor) o el NGF (Neural Growth Factor), los cuales al unir a sus ligandos forman homodímeros activos cuyas cinasas fosforilan residuos tirosina

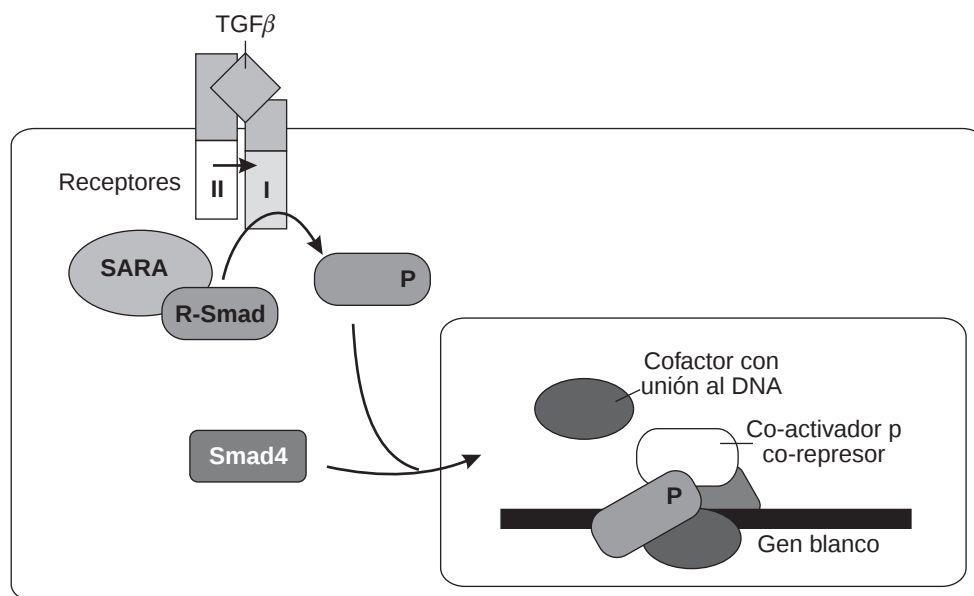


Figura 1. La vía de señalamiento del TGF- β .

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

**Memorial Sloan-Kettering Cancer Center and Howard Hughes Medical Institute New York City, N. Y., U.S.A. e-mail: j-massague@ski.mskcc.org

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Fernando López-Casillas. *Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-246, México D.F., 04510, Tel.: (55) 56 22 56 25. e-mail: fcasilla@ifisiol.unam.mx

en sus sustratos. Otra diferencia es la forma asimétrica y direccional como los receptores del TGF- β forman un complejo activo. La unión del TGF- β al receptor tipo II induce la formación de un complejo con el receptor tipo I, receptor que es incapaz de unir por sí mismo al ligando. Esta asociación permite que la cinasa del receptor tipo II, la cual es constitutivamente activa, fosforile una importante región reguladora exclusiva del receptor tipo I, la región GS, llamada así por su alto contenido de glicinas y serinas. La fosforilación de GS resulta en la activación de su cinasa y en la propagación de la señal del TGF- β .¹⁰ La fosforilación de los residuos Thr,¹⁸⁵ Ser,¹⁸⁷ Ser,¹⁸⁹ y Ser¹⁹¹ de la región GS del receptor tipo I del TGF- β induce un cambio conformacional de la cinasa que favorece la unión y fosforilación específica de sus sustratos fisiológicos y simultáneamente favorece la separación de una proteína inhibitoria del TGF- β , la inmunofilina FKBP12.¹¹ La FKBP12 se une a la región GS en su estado desfosforilado y mantiene a la cinasa en una conformación incapaz de actividad catalítica. La fosforilación de la región GS no sólo impide la unión de FKBP12, sino que crea un sitio de unión para los sustratos de la cinasa del receptor, por ejemplo la proteína Smad2. En este complejo el extremo carboxilo de Smad2, en donde residen las serinas por fosforilar, queda orientado hacia el sitio activo de la cinasa. Estos hallazgos indican que a nivel molecular, el proceso de "activación" de la cinasa del receptor tipo I consiste en la conversión de la región GS de un sitio de unión de un inhibidor en un eficiente sitio reclutador de su sustrato.¹¹

La propagación de la señal: los SMADS

Algunos miembros de una novedosa familia de reguladores transcripcionales, las proteínas Smad, son los sustratos fisiológicos de la cinasa del receptor tipo I.¹²

Existen tres variedades estructural y funcionalmente distintas de Smads. Las que son fosforiladas por la cinasa de un receptor tipo I se denominan "R-Smads", para distinguirlos de los Co-Smads y los Smads inhibitorios, otros miembros de la familia que no son sustratos de estas cinasas. El receptor tipo I del TGF- β fosforila a Smad2 y/o Smad3 en las serinas del motivo Ser-Xxx-Ser que se localiza en el extremo carboxilo de la proteína. Esta fosforilación induce la asociación del R-Smad con Smad4 (con un Co-Smad), dando lugar al complejo Smad2/Smad4 (o Smad3/Smad4) el cual se trasloca al núcleo celular en donde interactúa con otros reguladores transcripcionales para modular, positiva o negativamente, la expresión de los genes regulados por TGF- β . Este novedoso y sencillo mecanismo de señalamiento también es usado por los otros factores celulares que constituyen a la superfamilia del TGF- β . Esta superfamilia incluye factores de gran importancia biológica como las activinas, los BMP (Bone Morphogenetic Proteins), el MIH (Müllerian Inhibi-

tory Hormone), así como otros factores localizados en invertebrados como el dpp (decapentaplégico) que es un importante director del desarrollo en la mosca de la fruta.² Los receptores tipo I de algunos de ellos, como los de la activina, también fosforilan a Smad2 y Smad3, en cambio, los receptores tipo I de los BMPs fosforilan selectivamente a Smad1, Smad5 y Smad8. No obstante, las formas fosforiladas de estos R-Smads se asocian con Smad4, el único Co-Smad de mamíferos conocido. Las proteínas Smads consisten de dos dominios globulares evolutiva y funcionalmente conservados, los dominios MH1 y MH2 que se localizan al extremo amino y carboxilo de la proteína, respectivamente. El dominio MH1 une DNA reconociendo secuencias CAGAC, mientras que el dominio MH2 posee la actividad reguladora de la transcripción. Los Smads 2 y 3 (y posiblemente otros Smads también) tienen una tendencia intrínseca para localizarse en el núcleo celular, no obstante, en la célula la mayor parte de ellos se mantiene en el citoplasma. Esta retención está mediada, en parte, por su asociación con la proteína SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), la cual tiene al menos 3 funciones: mantener a los Smads en el citoplasma, ocluir la señal de localización nuclear presente en el dominio MH2 de los Smads y facilitar la presentación de los Smads a los receptores tipo I activados.¹³ Un efecto de la fosforilación de los R-Smads por el receptor tipo I es disminuir su afinidad por SARA, liberándolos de esta asociación, lo cual permite su unión con Smad4 y el desenmascaramiento de su señal de localización nuclear, lo cual resulta en su migración al núcleo celular.¹⁴

Una variante estructuralmente distinta de la familia son los I-Smads, o Smads inhibitorios (Smad6 y Smad7), los cuales tienen un dominio MH1 truncado y un dominio MH2 carente del motivo Ser-Xxx-Ser, pero con capacidad para unirse con los MH2 de los R-Smads. El Smad7 sobreexpresado por transfección, puede formar complejos estables con los receptores tipo I y II del TGF- β , pero a concentraciones fisiológicas el mecanismo que explica su efecto inhibitorio del TGF- β es su capacidad para formar complejos con los R-Smads, lo cual resulta en el bloqueo de su fosforilación por los receptores tipo I.⁵ La relevancia de los I-Smads es que pueden ser inducidos por TGF- β lo cual, en principio, les permitiría establecer asas de retroalimentación negativa moduladora de las acciones del factor.¹⁵

El contexto celular: un mar de colaboradores para los SMADS

Una de las primeras sorpresas del mecanismo de señalamiento del TGF- β fue descubrir que sólo dos receptores eran suficientes para mediar todas las respuestas celulares del factor. Estas respuestas, con su gran pleiotropía y variabilidad invitaban a la especulación sobre un elaborado y variado sistema de receptores y moléculas transducto-

ras. Sin embargo, el estudio sistemático de este problema, iniciado hace más de 12 años con la creación de líneas celulares con receptores mutantes incapaces de responder al TGF- β ^{16,17} y los más recientes estudios transcripcionales¹⁸ confirman que son suficientes dos receptores, 2 R-Smads y un Co-Smad para dar cuenta de las respuestas celulares del factor. De ahí que la interrogante actual sea explicar cómo el TGF- β genera tantas respuestas específicas con tan pocas piezas transduccionales. Esta cuestión se hace aún más crítica cuando se sabe que los dominios MH1 de los Smads se unen a elementos con secuencias CAGAC en forma poco selectiva y con baja afinidad, y que la unión con Smad4 poco contribuye a la especificidad de la respuesta.

Una primera respuesta vino del descubrimiento de que OAZ (Olf-Associated Zinc Finger), un factor transcripcional con motivos estructurales del tipo de los dedos de zinc es un mediador específico de linaje celular, de algunas respuestas de BMP. Las células P19, derivadas de un carcinoma embrionario, responden al BMP con la activación transcripcional del gen *Vent2*, un gen regulador del desarrollo que en *Xenopus* sp. suprime la neurogénesis y causa la ventralización del mesodermo, respuesta típica al BMP en los embriones de esta especie. En cambio, la línea embrionaria mioblástica C2C12, es incapaz de dicha respuesta a pesar de tener un juego funcional de los receptores y los R-Smads requeridos para otras respuestas al BMP. Mediante un análisis detallado de los elementos de respuesta al BMP en el promotor de *Vent2*, Hata et al. identificaron que la secuencia TGGAGC, vecina a la secuencia CAGAC, es indispensable para la activación de *Vent2* por BMP. Usando este par de elementos clonaron el factor transcripcional OAZ que se asocia con Smad1/Smad4 formando un complejo multiproteico que se une óptimamente a los elementos CAGAC y TGGAGC para mediar una completa estimulación de *Vent2* por BMP en las células P19.¹⁹ Como era de esperarse, la expresión de OAZ en células C2C12 les restituía esta respuesta. Otro aspecto relevante del trabajo de Hata et al. fue la determinación que las porciones de OAZ responsables de las respuestas de BMP (los dedos de zinc 9-19, de un total de 30) estaban separadas de las regiones de OAZ previamente identificadas como mediadoras de la activación transcripcional de otros genes no relacionados con BMP. OAZ ya era conocido como un activador de genes del epitelio olfatorio y de linfocitos B durante el desarrollo embrionario, acciones mediadas por su asociación con el factor transcripcional Olf/EBF y su unión a elementos de respuesta a través de los dedos de zinc 2-8. Estos hallazgos demostraron que un mismo cofactor transcripcional puede ser multifuncional y que dependiendo de su unión con otros coactivadores se determina la especificidad de su respuesta. En el caso de OAZ, si se une con los Smads actúa sobre genes con

elementos de respuesta a BMP y si se une con Olf/EBF lo hace sobre genes propios del linaje linfocítico u olfatorio.

Hoy en día es claro que los complejos R-Smad-Co-Smad funcionan casi siempre en colaboración con otros reguladores transcripcionales, reconociendo combinaciones específicas de elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco. En general, se puede hablar de varias categorías de colaboradores de los Smads. En una categoría se encuentran aquellos que carecen de actividad transcripcional propia y funcionan exclusivamente como adaptadores con capacidad de unión al DNA, como el OAZ y en otra los que además de unir secuencias específicas de DNA pueden activar o reprimir la transcripción de los genes blanco.⁷ Ejemplos de esta segunda categoría son JUNB, TFE3, CBFA/AML y LEF1/TCF, los cuales, además de cooperar en la vía de los Smads, también transducen señales extracelulares distintas a las del TGF- β , lo cual abre la posibilidad de integrar respuestas celulares complejas en función de los diversos estímulos que recibe la célula. La activación de la transcripción por estos complejos involucra a acetilasas de histonas como p300 y CPB que son atraídas al complejo a través de contactos con los Smads. De manera sobresaliente, los Smads también pueden asociarse con represores transcripcionales, por ejemplo las proteínas TGIF, SKI y SnoN, que tienen la capacidad de unirse a desacetilasas de histonas, enzimas cuyo efecto conduce a la condensación de la cromatina y de ahí a la represión transcripcional del DNA condensado. Un caso de especial relevancia es el de TGIF (TG3 interacting factor), pues mutaciones que afectan la dosis génica de TGIF causan la holoprosencefalia (HPE) en humanos. La HPE es un defecto genético que ocurre en 1 de cada 10,000 nacimientos y se caracteriza por la bifurcación incompleta de la parte anterior del tubo neural, dando lugar a malformaciones craneoencefálicas como la ciclopía y a ventrículos cerebrales fusionados.²⁰ TGIF es una proteína de vida media corta que se une a Smad2 compitiendo con el coactivador p300, de manera tal que la abundancia relativa de TGIF y p300 podría, en principio, determinar la naturaleza de algunas respuestas celulares al TGF- β . Es interesante hacer notar que EGF, a través de la vía de Ras, ocasiona la fosforilación de TGIF, lo cual resulta en la estabilización y un aumento en la vida media de la proteína, favoreciendo sus efectos represivos sobre la vía de los Smads.²¹ Estos hallazgos revelan al TGIF como un importante punto de contacto ("cross-talk") y regulación de dos vías de señalamiento antagónicas. Una conclusión de los ejemplos descritos anteriormente es que el llamado contexto celular, definido como la manera *sui generis* en que las células responden al ser estimuladas con TGF- β , consiste y tiene su sustento material en los distintos y prácticamente infinitos equi-

pos de colaboradores transcripcionales con que el núcleo de cada célula da la bienvenida al complejo R-Smad-Co-Smad. De ahí que hoy en día, al hablar de las acciones del TGF- β sea más pertinente preguntarse ¿qué hace la célula con la señal del TGF- β ? en vez de ¿qué le hace el TGF- β a la célula?

La respuesta anti-mitogénica del TGF- β .

Una de las cosas que las células de origen epitelial, endotelial, hematopoyético, neural y algunas mesenquimatosas, hacen al recibir la señal de TGF- β es dejar de proliferar. Sin duda uno de los aspectos más importantes de la biología del TGF- β es su capacidad para detener la división celular, pues la pérdida de dicha capacidad contribuye al fenotipo canceroso. De hecho, Smad4, la Co-Smad indispensable en la vía del TGF- β , fue identificada independientemente como el DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4), un gen causante de cáncer de páncreas, lo cual indica la relevancia que el TGF- β tiene en el control de la proliferación celular.²²

Las células de mamíferos llevan a cabo su división celular en una serie de etapas o fases que constituyen el llamado ciclo celular.²³ A nivel molecular, los engranajes que mueven al ciclo celular son los complejos entre un tipo de cinasas de proteínas, las cdk, (cyclin-dependent kinases) y sus subunidades reguladoras, las ciclinas.²⁴ Un evento clave para la proliferación celular es el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo, pues representa el compromiso de la célula para embarcarse en una nueva ronda de división. El avance a través de la transición G1/S requiere de la actividad de los complejos ciclina D-cdk4, ciclina D-cdk6, ciclina E-cdk2 y ciclina A-cdk2.²⁵ La actividad de estos complejos se necesita para fosforilar diversos mediadores de la progresión del ciclo celular, tales como la proteína Rb, el producto del gene del retinoblastoma. Varios mecanismos regulan la actividad cinasa de estos complejos ciclina-cdk: la presencia o ausencia de la ciclina, el nivel y tipo de fosforilación de la cdk y su asociación con proteínas inhibitoras de la cinasa, tales como p15, p21 y p27. El TGF- β detiene el ciclo celular en la fase G1 a través de dos mecanismos: regulando la expresión de genes responsables de la inhibición de las cdk y disminuyendo la expresión de c-myc, un factor transcripcional proto-oncogénico (Figura 2).

El TGF- β incrementa la expresión de los genes de p15 y p21 y reprime la expresión del gen cdc25A, el cual codifica una fosfatasa de tirosinas que remueve un fosfato inhibitorio de las cdk.³ Además, el incremento en los niveles de p15 mediado por el TGF- β tiene un interesante efecto colateral que refuerza la inhibición de los complejos ciclina-cdk, asegurando con ello la detención del ciclo celular. La proteína p27, a pesar de ser un inhibidor de las cdk, se acumula en los complejos ciclina D-cdk4/6, sin

que esto detenga el ciclo celular. De hecho se piensa que, debido a la manera en que se les une, p27 puede estabilizar los complejos ciclina D-cdk4/6 en las células en proliferación. Cuando TGF- β incrementa la expresión de p15 este inhibidor desplaza a p27 de los complejos ciclina D-cdk4/6 quedando en libertad para unirse al complejo ciclina E-cdk2, en donde tiene plena actividad inhibitoria de la cdk. De esta manera, al aumentar una sola clase de inhibidor de las cdk, el TGF- β inhibe a dos clases de ciclinas-cdk requeridas para la transición G1/S.

Una respuesta generalizada de todas las estirpes celulares que detienen su proliferación en presencia de TGF- β es la disminución en la expresión del protooncogene c-myc, un factor transcripcional mitogénico. Esta disminución es necesaria para estimular la expresión de p15 y p21 mediada por TGF- β . La expresión sostenida de c-myc en células epiteliales bloquea la activación transcripcional de p15 dependiente de TGF- β y las hace refractarias al efecto anti-mitogénico de TGF- β .²⁶ Si su concentración celular se mantiene por arriba de un umbral inhibitorio, c-myc se mantiene asociado a Miz-1 (Myc-interacting zinc-finger protein 1), un factor que tiene la capacidad de unirse al sitio iniciador del promotor del gen de p15. Este complejo Myc-Miz reprime en forma dominante la transcripción de p15, pues aunque existe un

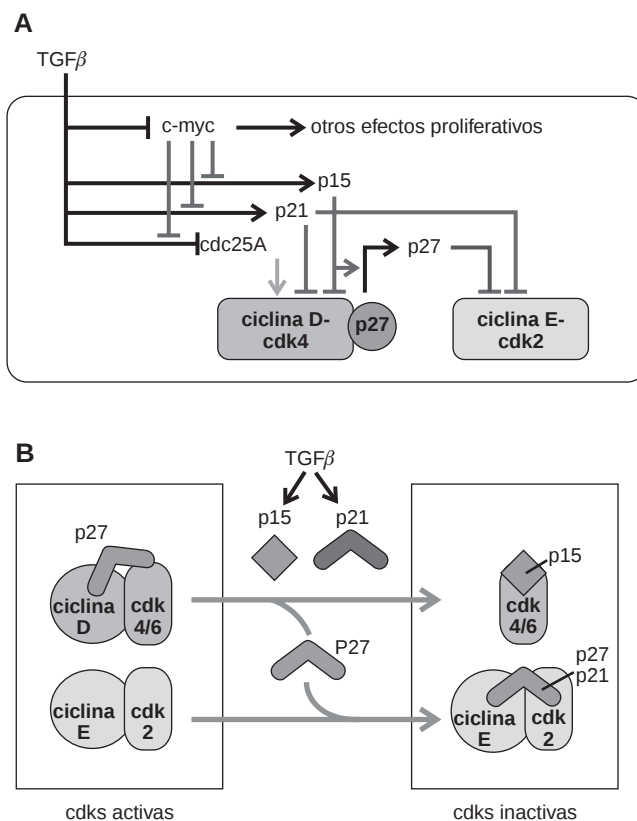


Figura 2. Los mecanismos antimitogénicos del TGF- β .

elemento clásico de respuesta a Smads (CAGAC) río arriba en el promotor de p15, éste es incapaz de abolir la represión de c-myc. Cuando los niveles de c-myc disminuyen por debajo del umbral, Miz-1 queda libre y en capacidad de unirse a un complejo transcripcional de Smads que se haya ensamblado en el elemento CAGAC, promoviendo la completa activación transcripcional de p15.¹⁸ Así pues, Miz-1 juega un papel dual en la expresión de p15 (y posiblemente también p21) funcionando como una base para el reclutamiento de factores activadores (Smads) o represores (c-myc) de la transcripción. Debido a que la represión mediada por c-myc es dominante sobre la activación de los Smads, para observar la respuesta anti-proliferativa completa del TGF- β , es indispensable primero reprimir la expresión de c-myc. Es importante hacer notar que la represión transcripcional de c-myc por TGF- β también está mediada por la vía de las Smads. En este caso el complejo R-Smad/Co-Smad se asocia con otras proteínas reguladoras para formar un complejo inhibitorio de la transcripción del gen de c-myc.²⁷ Es muy satisfactorio constatar que aun lo compleja que pueda ser la respuesta anti-proliferativa del TGF- β , su parte medular está mediada por la vía canónica de las Smads.

Epílogo

A pesar de la brevedad de esta revisión, esperamos haber compartido con el lector nuestra convicción de la indiscutible y meritoria prominencia del TGF- β en la biología y la medicina contemporáneas. Hemos dejado fuera de la discusión sus importantes funciones como regulador del desarrollo embrionario, de la reparación tisular y de la respuesta inmune, algunas de las cuales se discuten más ampliamente en otros artículos del presente simposio. No obstante, confiamos en que los aspectos que hemos cubierto de sus mecanismos de transducción darán al lector herramientas y estimularán su curiosidad para profundizar en este apasionante y trascendental tema.

Referencias

1. **Massagué J.** The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
2. **Kingsley DM.** The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetics tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-146.
3. **Massagué J, Blain SW, Lo RS.** TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
4. **Biobe GC, Schiemann WP, Lodish HF.** Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-1358.
5. **Massagué J.** TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.
6. **Massagué J, Chen Y-G.** Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 2000;14:627-644.
7. **Massagué J.** How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-178.
8. **Wrana JL.** Regulation of Smad activity. *Cell* 2000;100:189-192.
9. **Massagué J, Attisano L, Wrana JL.** The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994;4:172-178.
10. **Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.** Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994;370:341-347.
11. **Huse M, Muir TW, Xu L, Chen Y-G, Kuriyan J, Massagué J.** The TGF β receptor activation process: an inhibitor- to substrate binding switch. *Mol Cells* 2001;8:671-682.
12. **Macías-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL.** MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 1996;87:1215-1224.
13. **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;95:779-91.
14. **Xu L, Chen YG, Massague J.** The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGF β -dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2000;2:559-62.
15. **Nako A, Afrakhte M, Moren A, et al.** Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 1997;389:631-635.
16. **Laiho M, Weis FMB, Massagué J.** Concomitant loss of transforming growth factor- β receptor types I and II in cell mutants resistant to TGF- β . *J Biol Chem* 1990;265:18518-18524.
17. **Laiho M, Weis FMB, Boyd FT, Ignatz RA, Massagué J.** Responsiveness to transforming growth factor- β restored by complementation between cells defective in TGF- β receptors I and II. *J Biol Chem* 1991;266:9108-9112.
18. **Seoane J, Poupponnot C, Stalier P, Schader M, Eilers M, Massague J.** TGF β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15^{Ink4b}. *Nat Cell Biol* 2001;3:400-8.
19. **Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J.** OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP- Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 2000;100:229-40.
20. **Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, et al.** Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signaling to human neural axis determination. *Nat Genet* 2000;25:205-8.
21. **Lo RS, Wotton D, Massague J.** Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20:128-36.
22. **Hahn SA, Schutte M, Hoque ATMS, et al.** DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21. *Science* 1996;271:350-353.
23. **Nurse P.** A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-78.
24. **Murray A, Hunt T.** The Cell Cycle, an introduction. New York: Oxford University Press, Inc., 1993.
25. **Sherr CJ, Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.
26. **Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massague J.** Myc down regulation by transforming growth factor β required for activation of the p15^{Ink4b} G1 arrest pathway. *Mol Cell Biol* 1999;19:5913-22.
27. **Chen C-R, Kang Y, Siegel PM, Massague J.** E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell* 2002;110:19-32.