

Сигнальний шлях трансформуючого фактора росту β та його регуляція

О. В. Федоренко, Р. С. Стойка

Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

Наведено сучасні дані про структуру і функції лігандів, рецепторів та низхідних ефекторних білків сигнального шляху трансформуючого фактора росту β . Розглянуто механізми передачі сигналу на шляху від поверхні клітини до генів-мішеней у ядрі, способи їхньої регуляції та перехресні зв'язки з іншими сигнальними шляхами.

Ключові слова: ТФР β , рецептори, Smad білки, сигнальний шлях.

Вступ. Трансформуючий фактор росту β (ТФР β) — представник великої надродини цитокінів, які регулюють вражаюче широкий діапазон клітинних процесів, зокрема, проліферацію клітин, їхню детермінацію під час розвитку, диференціацію, рух, адгезію і загибель. Завдяки складним часовим і тканинспецифічним характеристикам своєї експресії ТФР β і близькі до нього фактори росту відіграють ключову роль у розвитку, гомеостазі та репарації практично всіх тканин у різних організмах — від дрозоді до людини. Фактори надродини ТФР β відповідають за значну частину внутрішньоклітинних сигналів, які вирішують долю клітини. Вплив цих факторів на клітини-мішені забезпечується поєднанням та активацією специфічних серин/треонінових протеїназ — рецепторів I і II типів, які передають сигнал від поверхні клітини до ядра через низхідні ефекторні Smad білки [1, 2].

Загальна характеристика лігандів надродини ТФР β . До надродини ТФР β належить велика кількість структурно споріднених поліпептидних факторів росту, прототип яких, ТФР β , виділено на

початку 1980-х років. Досить невдало він отримав свою назву через здатність індукувати фенотипову трансформацію культури епітеліальних клітин [3, 4]. Невдовзі було показано, що насправді він пригнічує ріст більшості епітеліальних та гемопоетичних клітин і регулює утворення позаклітинного матриксу мезенхімними клітинами. Виявилось, що вплив конкретних представників родини ТФР β на клітини-мішені відрізняється залежно від типу клітини та її стану [5].

У людини описано понад 40 представників родини ТФР β (станом на 2001 рік у її геномі знайдено 42 відкриті рамки зчитування, які кодуєть білки цієї родини) [6]. Багато ортологів відомо у миші, *Xenopus* та інших хребетних. Шість представників виявлено у *Caenorhabditis elegans* і дев'ять — у *Drosophila melanogaster* [7]. Родина ТФР β поділяється на дві головні гілки (BMP/GDF і ТФР β /активін/Nodal), представникам яких притаманні різноманітні, хоча й часто взаємодоповнювальні ефекти. Додаткові представники, зокрема інгібіни, діють як антагоністи лігандів. Деякі члени родини експресуються лише у кількох типах клітин або в обмежені періоди часу протягом розвитку, натомість інші є повсюдними як упродовж ембріогенезу, так і в зрілих тканинах. Прикладами

першого гатунку є АМН/МІС (анти-Мюллерівський гормон або речовина, що пригнічує розвиток Мюллерівських проток) і GDF8/міостатин; ТФР β 1 і BMP4 належать до другого [7, 8].

У ссавців відомо три різні ізоформи ТФР β — β 1, β 2 і β 3, структура яких кодується різними генами і які діють через однакову рецепторну сигнальну систему. Рівень ТФР β 1 найчастіше є підвищеним у ракових клітинах, і саме на цій ізоформі зосереджується більшість досліджень щодо ролі ТФР β в канцерогенезі [9]. Ізоформи ТФР β утворюють між собою гомодимери. Крім цього, відомі гетеродимери між ТФР β 1 і ТФР β 2, а також між ТФР β 2 і ТФР β 3. До функцій ТФР β лігандів належать зупинка клітинного циклу в епітеліальних і гемопоетичних клітинах та контроль проліферації і диференціації мезенхімних клітин. Вони також є сильними індукторами утворення позаклітинного матриксу і причетні до загоєння ран та імуносупресії. Три ізоформи ТФР β діють досить подібно і вироджено *in vitro*, проте *in vivo* характер їхньої експресії і функціонування чітко відрізняється [10]. За допомогою аналізу генів ізоформ ТФР β також показано, що кожен з них контролюється унікальним і відмінно регульованим промотором [11].

Представники підродини активіну можуть індукувати утворення гіпофізарного фолікулоstimулювального гормону (FSH), а також впливають на диференціацію клітин еритроїдного ряду та індукцію мезодерми у *Xenopus*. Різні представники активінів здатні утворювати гомо- або гетеродимери між різними β -субодинамиціями (β A, β B, β C, β E). Інгібіни утворені віддалено спорідненою α -субодинамицею, яка може формувати гетеродимери з різними β -субодинамиціями активінів. У такий спосіб вони протидіють утворенню FSH, а також іншим функціям активінів [12].

Білки, що контролюють морфогенез кісткової тканини (bone morphogenetic proteins, BMPs), є найбільшою групою серед надродини ТФР β і нараховують близько 20 представників. BMP можна розділити на різні підродини за структурною спорідненістю і фізіологічними ефектами. У 1982 році Спенсер та співавт. [13] показали, що мутанти *Drosophila* за геном *decapentaplegic* (*dpp*) мають ряд дефектів матриць розвитку і подвоєнь структур. Вони припустили, що комплекс генів *dpp* визначає позиційну інформацію під час розвитку епідермальної тканини. У результаті пошуку фак-

торів, здатних індукувати ектопічне формування кісток і хрящів, знайдено два гомологи DPP у ссавців, BMP2 і BMP4 [14]. Згодом показано, що BMP і *dpp* є функціонально взаємозамінними у мух і ссавців. Це засвідчує високу консервативність їхньої структури і функцій [15].

До підродини BMP2 належать BMP2, BMP4 і DPP. Ці пептиди впливають на процеси гастрულляції, нейрогенезу і міжпальцевого апоптозу у ссавців. У *Xenopus* BMP обумовлюють утворення матриць розвитку мезодерми, а у *Drosophila* — дорзалізацію ока і розвиток крила. До іншої підродини, BMP5, входять білки BMP5, 60A (його гомолог у *Drosophila*), BMP6/Vg1, BMP7/OP1 і BMP8/OP2. Разом з BMP4 і BMP2 вони причетні до розвитку практично усіх органів, а також виконують численні функції у розвитку нейронів [16].

Серед інших представників надродини ТФР β слід виокремити фактори росту та диференціації (GDFs). Білки підродини GDF5 важливі для формування хрящів при розвитку кінцівок, а Vg1 з однойменної підродини впливає на індукцію осьової мезодерми у земноводних і риб. Білки іншої підродини (BMP3), серед яких BMP3/остеогенін і GDF10, залучені до остеогенної диференціації, утворення хрящових кісток і хемотаксису моноцитів. Nodal — один з проміжних представників, бере участь в індукції осьової мезодерми та визначенні право-лівої асиметрії. Дорзалін регулює диференціацію клітин у нервовій трубці, а GDF8 відповідає за пригнічення росту скелетних м'язів [16].

Більш віддаленими представниками надродини ТФР β є анти-Мюллерівський гормон (АМН/МІС) і нейротрофний фактор, який походить з лінії гліальних клітин (GDNF). АМН зумовлює регресію Мюллерівських проток, у результаті чого формуються чоловічі статеві органи, а GDNF — це фактор, який забезпечує виживання і диференціацію дофамінергічних нейронів, а також впливає на розвиток нирок. Цікаво, що на відміну від інших ТФР β -подібних лігандів GDNF діє через рецептор Ret з тирозинкіназною активністю, а не через серин/треонінові кінази [17].

Біосинтез і структурні властивості представників родини ТФР β . Зрілі форми ТФР β є димерними білками з молекулярною масою близько 25 кДа. Наприклад, попередник ТФР β 1 містить 391 амінокислотний залишок (а. з.), з яких 112 С-кінцевих а. з. утворюють зрілий пептид. У складі цього білка знаходяться три потенційних сайти глікозилування

[18]. Характерною особливістю структури більшості представників родини ТФРβ є наявність у молекулі семи дуже консервативних залишків цистеїну, шість із яких утворюють так званий «цистеїновий вузол», а один відповідає за димеризацію молекули [19].

Усі ТФРβ-подібні поліпептиди синтезуються у вигляді неактивних попередників, які згодом підлягають процесингу в апараті Гольджі за участі фурину, представника родини ендопротезаз — конвертаз. До апарату Гольджі білок-попередник спрямовується за допомогою N-кінцевого сигнального пептиду. Попередник розщеплюється фурином у RXXR сайті, локалізованому на відстані 112—114 а. з. від C-кінця, з утворенням C-кінцевої ТФРβ-частини і N-кінцевого залишку, який має назву латентно-асоційованого пептиду (latency-associated peptide, LAP). N-кінцева ділянка і зріла частина ТФРβ формують неактивний нековалентний малий латентний комплекс (small latent complex, SLC), значно стабільніший, аніж активна форма ТФРβ. Процесинг в апараті Гольджі продовжується формуванням дисульфідних зв'язків між LAP і білком, що зв'язує латентний ТФРβ (latent TGFβ і binding protein, LTBP), з утворенням великого латентного комплексу (LLC) [20].

Роль LTBP полягає у стабілізації SLC комплексу і полегшенні його секреції, забезпеченні правильного згортання ТФРβ і спрямуванні латентного комплексу або до поверхні клітини для активації, або в позаклітинний матрикс певних клітин чи тканин для зберігання [20]. Додатковою функцією LTBP є вплив на активацію ТФРβ інтегринової сигналізації. Показано, що LTBP-1, 2 і 4 містять RGD послідовності, які є сайтами зв'язування інтегринів. Великі латентні ТФРβ комплекси можуть безпосередньо зв'язуватися з інтегрином $\alpha_v\beta_1$ на поверхні клітини. Специфічний епітеліальний інтегрин $\alpha_v\beta_6$ може зв'язуватися з RGD мотивом у LAP, що вказує на можливість опосередкованої цитоскелетом активації ТФРβ [21].

Кінцева активація ТФРβ фізично контролюється зв'язуванням LAP з рецепторами манозо-6-фосфату і протеазами, які розщеплюють LAP, зокрема, плазміном і катепсином [20]. Ще одним важливим активатором ТФРβ *in vivo* виявився тромбоспондин-1, який індукуює конформаційну зміну в LAP, що призводить до активації ТФРβ [22]. Цікаво, що ТФРβ індукуює утворення інгібітора-1 активатора плазміногену (PAI-1), тобто

існує певний рівень самоконтролю цього процесу. Іншим потенційним активатором є матриксна металопротеаза-9 (MMP-9), яка здатна активувати латентні ТФРβ2 і ТФРβ3 *in vitro* [23].

Біоактивні представники родини ТФРβ можуть асоціюватися з кількома позаклітинними білками, що модулюють їхню активність. Знайдено, що активність ТФРβ пригнічується протеогліканами позаклітинного матриксу декорином і бетагліканом [24]. Крім цього, α_2 -макроглобулін може виконувати роль кліренс-фактора для циркуляції ТФРβ і активінів у сироватці крові [25].

Рецептори ТФРβ та механізми їхньої взаємодії з лігандами. Родини рецепторів I і II типу. Сигнали ТФРβ і споріднених факторів передаються за допомогою родини трансмембранних серин/треонінових протеїнкіназ, які називають родиною рецепторів ТФРβ. На основі їхніх структурних і функціональних властивостей родину рецепторів ТФРβ поділяють на дві підродини: рецептори I і II типів. Під час пошуку рецепторів для ТФРβ виявлено ще два мембранних глікопротеїни — бетаглікан і ендоглін (рецептори III типу), яким не властива сигнальна функція, хоча вони й можуть регулювати доступ ТФРβ до сигнальних рецепторів [2, 26, 27].

Підродину рецепторів I типу у хребетних у свою чергу ділять на три підгрупи за особливостями кіназних доменів і сигнальних активностей. До першої групи у ссавців належать TβRI, ActRII і ALK-7, до другої — BMPRIA і BMPRII та до третьої — ALK-1 і ALK-2. Оскільки рецептори I типу незалежно клонували окремі групи дослідників, часто один і той самий білок може мати різні назви. Спочатку застосовували більш «нейтральну» номенклатуру ALK (активін-подібна рецепторна кіназа), а згодом, після ідентифікації фізіологічних лігандів, рецепторам присвоювали змістовніші назви. Так, рецептор ТФРβ I типу вперше описано як ALK-5, а потім потім він отримав назву TβRI [28].

До підродини рецепторів II типу у хребетних належать TβRII, BMPRII і AMHR, специфічними лігандами для яких є ТФРβ, BMPs і MIS відповідно. Рецептори ActRII і IIB зв'язують активіни, якщо експресуються лише вони самі або разом з рецепторами активінів типу I. Щоправда, якщо ActRII і IIB експресуються разом з рецепторами BMP типу, то вони можуть зв'язувати BMP-2, 4, 7, а також GDF5 [17, 26, 29].

За результатами секвенування геному людини,

родина рецепторних серин/треонінових кіназ у людини нараховує 12 представників — сім рецепторів типу I і п'ять — типу II; усі вони причетні до передачі сигналів від ТФР β -лігандів [6].

Представниками родини рецепторів ТФР β у безхребетних є Thick veins (Tkv) і Saxophone (Sax), які виконують роль рецепторів Dpp типу I у *Drosophila*. Tkv найближчий до рецепторів BMPRI ссавців, а Sax дещо більше нагадує білки ALK1 і ALK2. Роль рецептора II типу для Dpp виконує Punt, який функціонує разом з Tkv і Sax. Розвиток личинки у *C. elegans* контролюють білки Daf-1 і Daf-4, які відповідно є рецепторами I і II типів для BMP-подібного ліганду Daf-7 [26, 30, 31].

Структурні властивості рецепторів. Рецептори ТФР β I і II типів — мембранні глікопротеїни з молекулярними масами близько 55 і 70 кДа відповідно. Внутрішньомолекулярні поліпептиди цих білків мають довжину від 500 до 570 а. з. разом із сигнальними пептидами. Позаклітинна ділянка відносно коротка (близько 100 а. з.), N-глікозилувана і містить 10 або більше залишків цистеїну, які можуть визначати загальний характер згортання цієї ділянки [2].

Трансмембранна і цитоплазматична примембранна ділянки рецепторів I і II типів не мають помітних структурних особливостей. Щоправда, деякі залишки серину у цих ділянках можуть фосфорилуватися як у ліганд-залежний, так і ліганд-незалежний способи, модулюючи активність рецепторів. Унікальною рисою рецепторів I типу є висококонсервативна ділянка завдовжки 30 а. з., розташована одразу перед протеїнкіназним доменом. Вона має назву ζ S домену завдяки характерній послідовності SGSGSG. Для активації сигналізації необхідно ліганд-індуковане фосфорилування рецептором II типу залишків серину і треоніну у послідовності TTSGSGSG рецептора T β RI [32]. Одразу за SGSGSG мотивом усі рецептори I типу містять мотив Leu-Pro, який є сайтом зв'язування імунофіліну FKBP12, що може діяти як негативний регулятор сигнальної функції рецепторів [33].

Кіназний домен у рецепторів I і II типів відповідає канонічній послідовності кіназних доменів серин/треонінових протеїнкіназ [34]. Рецептори I типу фосфорилують свої субстрати — Smad білки по залишках серину, а рецептори II — фосфорилують самі себе, а також рецептори I типу по залишках серину і треоніну, але не тирозину [32].

Коротка C-кінцева ділянка, розташована після кіназного домену у T β RII, хоча й фосфорилується, проте не відіграє ніякої ролі у передачі сигналу. У рецепторах I типу така ділянка відсутня.

Лігандно-рецепторні взаємодії і активація рецепторів. Зв'язування димерного ліганду ТФР β з позаклітинними доменами обох типів рецепторів індукує тісне зближення і продуктивну конформацію їхніх внутрішньоклітинних кіназних доменів, що дозволяє фосфорилування рецептором II типу рецептора I типу і його наступну активацію. ТФР β зв'язується зі своїми рецепторами послідовно: спочатку димер ліганду зв'язується з парою рецепторів II типу, після чого цей комплекс взаємодіє з парою рецепторів I типу, залучаючи їх до рецепторного комплексу. Цей же спосіб характерний для зв'язування активіну його рецепторами. Натомість, BMP білки зв'язуються зі своїми рецепторами кооперативно [35].

У неактивному стані рецептор T β RI нефосфорильований, на відміну від T β RII, який фосфорильований в основному по залишках серину. Кіназна активність T β RII, схоже, є конститутивною, тобто ліганд є необхідним не для активації протеїнкінази, а для її взаємодії з субстратом — T β RI. Рецептор T β RII у нативному стані може утворювати лігандно-незалежні гомоолігомери, які після зв'язування ліганду сприяють утворенню гетеромерного T β RI/T β RII рецепторного комплексу. Механізм активації рецептора I типу може полягати у зростанні його кіназної активності або в утворенні субстрат-зв'язувальних сайтів для Smad білків [7, 35].

Регуляція рецепторів ТФР β . Доступ ТФР β лігандів до їхніх рецепторів регулюється двома класами молекул з протилежною функцією. Перший клас включає різноманітні розчинні білки, що виконують функцію ліганд-зв'язувальних пасток. Вони секвеструють ліганд і унеможливають його доступ до мембранних рецепторів. До цього класу належить про-ділянка попередника ТФР β (LAP), малий протеоглікан декорин і циркулюючий білок α 2-макроглобулін.

Другий клас регуляторів доступу — це закорені у мембрані білки, які відіграють роль допоміжних рецепторів, або корецепторів, що посилюють зв'язування ліганду сигнальними рецепторами [7]. Мембранний глікопротеїн бетаглікан, відомий раніше як рецептор ТФР β III типу, регулює зв'язування ТФР β з рецептором II типу, що є

особливо критичним для ізоформи ТФР β 2 [36]. Зв'язування ТФР β з рецепторами також посилюється за рахунок фактора росту сполучної тканини (CTGF). Споріднений з бетагліканом білок, ендоглін, сприяє зв'язуванню поки що невизначеного ТФР β ліганду з рецептором типу I ALK1 в ендотеліальних клітинах. Ця функція може бути суттєвою у гомеостазі судин [7].

Показано, що з рецепторними комплексами ТФР β на поверхні клітини взаємодіють також кілька внутрішньоклітинних білків. Один з них, FKBP12, конститутивно взаємодіє з примембранним доменом рецепторів типу I, внаслідок чого регулює його конформацію і чутливість передачі сигналу [33].

З рецепторним комплексом після індукованої лігандом активації взаємодіють три білки, які містять WD повтори. Далі ці білки фосфорилуються і регулюють його активність. Білок TRIP-1 взаємодіє з Т β RII, В β -субодинаця протеїнфосфатази 2A — з рецепторами типу I, а STRAP — як із Т β RII, так і з Т β RI. Усі вони пригнічують активність ТФР β сигналізації. Регуляторна роль цих білків чітко описана, проте немає переконливих доказів на користь того, що білки з WD повторами є ефекторами ТФР β відповідей. Винятком є В α -субодинаця протеїнфосфатази 2A, яка може бути причетна до зупинки росту за рахунок інактивації S6-кіназного шляху [37, 38].

Для рецепторів ТФР β , як і для більшості рецепторів, описано механізми інтерналізації та рециклізації внаслідок ендоцитозу. Вони можуть бути не лише засобом негативної регуляції, але й сприяти передачі сигналу завдяки спрямуванню сигнальних комплексів до специфічних внутрішньоклітинних мішеней. Інтерналізація активованих рецепторів ТФР β відбувається двома окремими шляхами ендоцитозу.

Перший — клатрин-залежний — забезпечує активацію білка Smad2 через фосфорилування його С-кінцевої частини Т β RI. Інтерналізація опосередковується багатим на лейцин мотивом у Т β RII, який зв'язується з AP2, компонентом вкритих клатрином заглиблень.

Другий шлях — ендоцитоз, обумовлений ліпідними скупченнями і кавеолами (raft-caveolae endocytosis), спричинює розщеплення рецепторів. У такий спосіб за рахунок розділення рецепторів ТФР β по компартментах під час ендоцитозу регулюється передача сигналу і кругообіг рецепторів.

Питання про місце проходження ТФР β -сигналізації — у плазматичній мембрані чи в ендосомному компартменті — залишається відкритим [39].

Внутрішньоклітинна передача сигналу ТФР β через Smad білки. Структура Smad білків та їхня функціональна класифікація. Передача сигналів від активованих комплексів рецепторів ТФР β до генів-мішеней у ядрі здійснюється за допомогою спеціального класу низхідних сигнальних молекул, відомих як Smad білки. Перший представник родини Smad виявлено у *Drosophila* і названо Mothers against dpp (Mad) [40]. Після цього у *C. elegans* знайшли три Mad-гомологічних гени — *sma-2*, *sma-3* і *sma-4* [41]. Згодом у ссавців ідентифіковано вісім Mad гомологів, які отримали назву Smad [42].

Родину білків Smad поділяють на три окремих класи за особливостями їхніх функцій і структури, а саме: 1) рецептор-регульовані Smads (R-Smads); 2) загальні Smad посередники (common mediator Smads, Co-Smads); 3) інгібіторні Smads (I-Smads). Усі R-Smads містять мотив SSXS на самому С-кінці, який є безпосередньою мішенню для активованих рецепторних кіназ типу I. Серед них Т β RI (ALK5) і рецептор активіну I типу (ALK4) фосфорилують Smad2 і Smad3, а рецептори BMP типу I (ALK2, ALK3 і ALK6) каталізують фосфорилування Smad1, Smad5 і Smad8 [42—44].

Co-Smad білок, Smad4, не фосфорилується активованими рецепторами типу I, але утворює гетеромерні комплекси з активованими R-Smads. На важливість Smad4 вказує його роль як антионкогенного білка: мутації або делеції Smad4 часто асоційовані з канцерогенезом [45]. Єдиним Co-Smad у ссавців є Smad4, натомість у *Xenopus* є два Co-Smad: гомологічний до Smad4 Smad4a і Smad4b.

I-Smads, Smad6 і Smad7 діють протилежно до сигнальних R- та Co-Smads і є антагоністами ТФР β сигналізації [46].

Smad білки містять три домени: Mad-гомологічний домен (MH) типу 1 на N-кінці, С-кінцевий MH2 домен і багату на пролін лінкерну ділянку. MH1 і MH2 домени є консервативними серед Smad-білків, за винятком I-Smads, які не містять MH1 домену [30]. MH1 домен важливий для ядерної акумуляції, прямого зв'язування з ДНК, а також для взаємодій з ДНК-зв'язувальними білками. За контакт з ДНК відповідає петля з мотивом і шпильки у MH1 домені. Домен MH2 також виконує кілька важливих функцій — він

обумовлює взаємодію з рецепторами, рецепторну активацію, формування гомо- і гетероолігомерних Smad комплексів і безпосередній контакт з ядерним поровим комплексом під час ядерно-цитоплазматичного курсування.

Більшість мутацій гена *Smad4*, які є причиною раку, розташовані у МН2 домені і порушують ТФР β сигналізацію, перешкоджаючи утворенню гомо- і гетероолігомерних комплексів із R-Smad білками. У неактивному стані домені МН1 і МН2 пригнічують функції один одного [47]. Хоча лінкерна ділянка не є консервативною, вона містить кілька консервативних сайтів фосфорилування MAP кіназами, причетних до негативної регуляції активності Smad білків, а також багатий на пролін PY мотив, який зв'язується з WW доменами білків Smurf [48].

Активация R-Smad білків. Першим кроком внутрішньоклітинного шляху ТФР β /Smad є залучення Smad білків до рецепторного комплексу. Виявлено кілька білків з функціями якорів, скефолдів і/або шаперонів, які регулюють та прискорюють процес залучення. Прикладом таких білків є SARA (Smad anchor for receptor activation), який регулює субклітинний розподіл Smad2 і Smad3. SARA локалізується у ранніх ендосомах, взаємодіючи з PI(3)P своїм FYVE доменом. Цей білок одночасно взаємодіє із Smad2/3 за допомогою Smad-зв'язувального домену (SBD) і ТФР β рецепторним комплексом через свою С-кінцеву ділянку. Після презентації Smad2/3 до T β RI вони фосфорилуються і дисоціюють від SARA і рецептора, щоб утворити комплекс із Smad4 [49].

У взаємодії білків Smad з рецепторним комплексом можуть брати участь елементи цитоскелету — мікротрубочки і актинові філаменти, а також низка інших білків — Hrs/Hgs (ще один білок з FYVE доменом), філамін (фактор зшивання актину і скефолд-білок, позитивний регулятор Smad сигналізації), кавеолін 1 (опосередковує локалізацію рецепторних комплексів у кавеолах), сортувальні нексини (SNXs) (внутрішньоклітинні регулятори переміщення рецепторних тирозинкіназ), ARIPs (посилюють Smad2 сигналізацію у відповідь на активін), GIPC (скефолд-білок для α -субодиниць G білків, містить PDZ домен, взаємодіє з T β RIII), TRAP1 (якір для Smad4, що сприяє утворенню олігомерів R-Smad/Co-Smad), Dab2, 14-3-3 ϵ і аксин (адапторні білки) [30, 42, 43].

Активация R-Smads відбувається шляхом фос-

форилування по С-кінцевому SSXS мотиву. Фосфорильований С-кінець R-Smads специфічно взаємодіє з петлею L3 інших Smad білків, що спричиняє їхню олігомеризацію. При цьому можуть утворюватися гетеротримери із двох R-Smads і одного Smad4 або гетеродимери [50].

Транслокація активних Smad комплексів у ядро. Рецептори ТФР β залишаються активними протягом принаймні 3—4 год після зв'язування ліганду, спрямовуючи комплекси Smad білків у ядро, де вони регулюють транскрипцію генів-мішеней. Імпорт Smad комплексів у ядро відбувається за «класичною» схемою, характерною для багатьох інших білків.

За відсутності стимуляції лігандом R-Smads локалізуються в цитоплазмі, у той час як Smad4 знаходиться і в ядрі, і в цитоплазмі. Ядерний импорт R-Smads не потребує Smad4, хоча останній і котранслокується з ними. Транслокація Smad1 і Smad3 до ядра забезпечується багатою на лізин послідовністю ядерної локалізації (NLS) у МН1 домені. С-кінцеве фосфорилування МН2 домену і наступні конформаційні зміни можуть експонувати NLS і дозволяти її зв'язування з імпортином- β . З іншого боку, импорт Smad2 у ядро може бути імпортином- β -незалежним і забезпечуватися доменом МН2 [51].

У ядрі R-Smads постійно дефосфорилуються, що спричиняє дисоціацію їхніх комплексів та експорт неактивних Smad білків у цитоплазму. Нуклеоцитоплазматичне курсування Smad2 відбувається завдяки взаємодії його МН2 домену з нуклеопоринами CAN/Nup214 і Nup153 [52]. На відміну від ліганд-залежного імпорту R-Smad білків, Smad4 постійно курсує між ядром і цитоплазмою, оскільки містить конститутивно активну NLS у МН1 домені і сигнал експорту з ядра (NES) у лінкерній ділянці, активність якого залежить від ядерного транспортного рецептора CRM1. Цей NES може маскуватися у комплексах із R-Smads, дозволяючи їхнє накопичення у ядрі [51].

Негативна регуляція R-Smad і Co-Smad білків. Представників окремого класу Smad білків (I-Smads), Smad6 і Smad7 ідентифіковано як інгібітори ТФР β сигналізації. Суттєва різниця між цими двома білками полягає в тому, що Smad7 є спільним інгібітором для всіх представників родини ТФР β , а Smad6 специфічно блокує BMP сигналізацію. мРНК I-Smad білків швидко індукуються після стимуляції ТФР β , що забезпечує автокринний

негативний зворотний зв'язок для контролю інтенсивності та тривалості ТФР β сигналу [53, 54].

За відсутності ліганду I-Smads переважно знаходяться у ядрі. Стимуляція ТФР β викликає їхній експорт з ядра і ефективну взаємодію з активованим рецептором типу I. У такий спосіб пригнічується взаємодія останнього із R-Smads [53, 54]. WD-вмісний білок STRAP (serine/threonine kinase receptor-associated protein) сприяє взаємодії Smad7 з T β RI [55]. Промотори I-Smad білків містять паліндромні послідовності SBE, здатні зв'язувати активований Smad3—Smad4 комплекс і, отже, індукуються ТФР β [56].

Білки Smurf (Smad ubiquitination regulatory factor) є специфічними E3 убіквітинлігазами, які забезпечують убіквітинуювання та протеасомне розщеплення Smad білків. Виявлено, що PY мотив у Smad7 конститутивно взаємодіє з WW доменами білків Smurf1 і Smurf2. Після залучення комплексу Smad7/Smurf до активованого рецептора ТФР β індукується розщеплення останнього через протеасомний і лізосомний шляхи [48]. Сам Smad7 захищається від Smurf-залежного убіквітинуювання і розщеплення завдяки ацетилюванню по двох залишках лізину — сайтах-мішенях для Smurfs [57].

R-Smad-білки також є мішенями для Smurfs, причому Smurf1 вибірково взаємодіє з BMP-Smads, а Smurf2 — з усіма R-Smads. Крім цього, активований Smad2 у ядрі є мішенню для E2 ензимів UbcH5b/c і Ubc3, а Smad3 — для E3-лігазного комплексу SCF/Roc1. Специфічні механізми розщеплення для білка Smad4 залишаються невизначеними, хоча загалом зрозуміло, що убіквітин-залежне розщеплення через протеасомні шляхи є загальним механізмом контролю кількості Smad білків і пригнічення ТФР β сигналізації [58, 59].

Механізми ТФР β /Smad-залежної регуляції експресії генів. Функції ТФР β як фактора росту плейотропної дії асоціюються зі змінами в експресії цілої низки генів. Знайдено, що ТФР β зазвичай модулює експресію генів на рівні ініціації транскрипції. Досягнуто значного прогресу в ідентифікації ТФР β -чутливих генів та асоційованих з ними регуляторів транскрипції. Описано також кілька прикладів ТФР β -залежного пост-транскрипційного або трансляційного контролю експресії генів. До них належать дестабілізація мРНК альбуміну і аполіпропротеїну А під час гострої фази реакції печінки на ушкодження, трансляційна авторепресія мРНК ТФР β 1, а також репресія транс-

ляції мРНК Cdk4. Поки що молекулярні механізми подібних типів контролю залишаються малозрозумілими [60].

Транскрипційні комплекси Smad білків. Для ініціації експресії генів Smad білки повинні упізнати гени-мішені в ядрі і зв'язуватися з ними. Крім цього, вони взаємодіють з іншими ДНК-зв'язувальними білками, зокрема, з транскрипційними коактиваторами і корепресорами, максимально використовуючи можливості транскрипційної регуляції [42, 43, 61]. За допомогою вивільненого після активації МН1 домену Smad4 і R-Smads (крім Smad2) зв'язуються зі специфічною послідовністю ДНК (5'-AGAC-3'), відомою як Smad-зв'язувальний елемент (SBE). SBE елементи виявлено у промоторних ділянках багатьох ТФР β -чутливих генів [62]. За безпосередній контакт з ДНК відповідальною є петля МН1 домену з β -шпилькою. Білок Smad2 не здатний безпосередньо зв'язуватися з ДНК через вставку 30 а. з. у цій ділянці [63].

Першими з коактиваторів, що утворюють комплекси зі Smad-білками у ліганд-залежний спосіб, виявлено білок p300 і структурно близькоспоріднений CREB-зв'язувальний білок (CBP) [64]. Вони сприяють активації транскрипції завдяки своїй гістон-ацетилазній активності (НАТ), що послаблює жорсткість структури хроматину. Крім цього, p300/CBP виконує роль фактора сполучення між транскрипційними факторами і транскрипційним апаратом. Утворення p300/CBP—Smad4 комплексу регулюється білками MSG1 (стабілізатор взаємодії p300/CBP з SAD доменом Smad4) [65] і SNIP1 (білок із forkhead-асоційованим доменом, інгібітор цієї взаємодії) [66].

Регуляція транскрипції, спричинена ТФР β , залежить від здатності Smad білків до залучення різних хроматин-ремоделювальних білків. Одним із них є корепресор TGIF, гомеодомен-вмісний білок, який приєднує гістондеацетилазу (HDAC) mSin3 до активованого ТФР β Smad комплексу. Ця взаємодія є взаємовиключною із зв'язуванням p300/CBP і репресує експресію гена-мішені [67]. Іншими транскрипційними корепресорами для Smad-білків є структурно споріднені продукти протоонкогенів Ski і SnoN. Їхня взаємодія із Smads спостерігається при звичайних умовах і зникає після стимуляції ТФР β [68, 69].

Складні плейотропні ефекти сигнальних каскадів ТФР β не можуть забезпечуватися лише взаємодією Smad білків з ДНК. Причинами цього є,

зокрема, низька ДНК-зв'язувальна спорідненість Smad білків і неселективність їхнього зв'язування з SBE елементами [63]. Аналіз промоторів генів-мішеней для ТФР β показує, що їхня транскрипційна регуляція досягається за рахунок взаємодії Smads з іншими транскрипційними факторами. Такі комплекси можуть утворюватися незалежно від зв'язування з ДНК або потребувати його для більшої селективності.

Першим прикладом транскрипційних факторів, які взаємодіють із Smad білками, став білок *Xenopus* FAST-1 (forkhead activin signal transducer-1), який у комплексі зі Smad2 і Smad4 зв'язується з активін-чутливим елементом (ARE) у промоторі гена *Mix.2* [70].

Згодом було виявлено велику кількість транскрипційних кофакторів, які асоціюють і взаємодіють із Smad білками, позитивно або негативно регулюючи транскрипційні відповіді. Так, позитивна транскрипційна регуляція може відбуватися внаслідок асоціації з AP-1 (*c-Jun/c-Fos*), білками родин SP1 і AML, β -катеніном і LEF1/TCF, TFE3, (TREs)/AP-1, а також рецептором вітаміну D (VDR). Прикладами транскрипційних репресорів, що взаємодіють із Smad білками, є Нохс-8, SIP1/ZEB-2, *Evil* і *YY1* [42, 43].

ТФР β -чутливі гени. Гени, ініціація транскрипції яких регулюється ТФР β , загалом можна поділити на чотири категорії: 1) гени компонентів або регуляторів білків позаклітинного матриксу (extracellular matrix, ECM) і міжклітинної комунікації; 2) гени — регулятори клітинного циклу; 3) тканинспецифічні гени і 4) гени факторів росту і їхніх рецепторів [60].

Перший клас ТФР β -чутливих генів кодує білки, причетні до прискорення загоєння ран і ремоделювання ECM, зокрема, колагени, протеоглікани, фібронектин, інтегрини та інгібітори протеаз ECM [71].

Другий клас генів, контрольованих ТФР β , — це гени, асоційовані з регуляцією клітинного циклу. У кератиноцитах ТФР β , який є інгібітором росту для цих клітин, знижує транскрипцію онкогену *c-myc* [72] і цикліну A [73], а також індукуює утворення мРНК інгібіторів циклін-залежних кіназ p15INK4B [74] і p21CIP/WAF1 [75]. З іншого боку, у фібробластах ліній NIH3T3 і AKR-2B, проліферація яких посилюється ТФР β , останній індукуює експресію генів *c-jun* і *c-fos*, які є позитивними регуляторами клітинного циклу [76].

До третього класу належать гени — регулятори тканинспецифічних функцій. Так, ТФР β як інгібітор гемопоезу знижує рівні мРНК і білка steel-фактора та його рецептора у гемопоетичних попередниках. Під час розвитку скелетних м'язів ТФР β пригнічує експресію генів міогеніну, *MyoD* і м'язового α -актину [60]. Вплив ТФР β на експресію генів четвертого класу дозволяє ампліфікацію його регуляторних функцій через утворення авто- та паракринних зворотних зв'язків. Про це свідчить той факт, що ТФР β індукуює експресію мРНК не лише трьох своїх ізоформ, але й трьох типів власних рецепторів [77]. ТФР β може також опосередковано регулювати експресію своїх генів-мішеней, модулюючи біологічні функції інших цитокінів-регуляторів експресії генів.

cis-Елементи ТФР β -чутливих промоторів [60]. Детальний функціональний аналіз промоторів деяких генів-мішеней для ТФР β дозволив ідентифікувати потенційні *cis*-діючі чутливі елементи для ТФР β і відповідні *trans*-діючі фактори. Більшість з них — позитивні контролюючі елементи, наприклад: 1) *TbRE* елемент промотору мишачого колагену $\alpha 2(I)$, який містить сайти зв'язування *CTF/NF-I* і *Sp1*; 2) *T β RE* елементи промоторів *p15INK4B* і *p21CIP/WAF1*, які зв'язують *Sp1*-подібні білки; 3) елемент промотору *PAI-1*, що містить перекриті сайти зв'язування *CTF/NF-I* і *USF*; 4) чутливі елементи промоторів генів ТФР $\beta 1$ і людського $\alpha 2(I)$ -колагену, які зв'язують *AP-1*-подібні білки; 5) *SRE-* і *TEF1*-вмісний елемент промотору скелетного α -актину і 6) *ARE* елемент промотору *Mix.2*, який відповідає на дію не лише активіну, але й ТФР β і *BMP-4*.

Серед чутливих елементів, які зумовлюють ТФР β -залежну репресію транскрипції, можна назвати елемент *TIE* промотору *транзину*, що взаємодіє з *FOS*-подібним білком, а також *октамер-бокс* і *CREB*-зв'язувальний сайт в *енхансері IL-2* у промоторі цикліну A.

Зв'язок шляху ТФР β з іншими сигнальними шляхами. Ще й досі Smad білки вважаються єдиними субстратами рецепторів ТФР β і переносниками сигналів ТФР β . Однак постійно зростає кількість доказів на користь того, що активація рецепторів ТФР β може запускати інші, Smad-незалежні сигнальні шляхи, хоча й незрозуміло, у який спосіб вони механістично сполучаються з активацією рецепторів і яким є їхній внесок у ТФР β відповіді. Транскрипційна активація Smad білків завдяки

їхнім фізичним взаємодіям і функціональній співпраці з транскрипційними факторами забезпечує взаємозв'язок сигнального шляху ТФР β з іншими сигнальними шляхами [31, 61].

Взаємозв'язок шляхів ТФР β і Ras/MAPK. Активация MAP-кіназного шляху, яка зазвичай спостерігається у ракових клітинах, а також Jun кінази або MAP кінази p38 регулює ТФР β -індуковану транскрипцію з промоторів, що містять ТФР β -чутливі сайти зв'язування AP-1 (*c-Jun/c-Fos*) або CREB/ATF і Smad-зв'язувальні сайти [78, 79]. Найпомітнішим прикладом є експресія білків позаклітинного матриксу і протеаз у відповідь на ТФР β , яка потребує інтактної AP-1-зв'язувальної послідовності промотору і залежить від Ras/MAP-кіназного і фосфатидилінозитол-3-OH кіназного (PI-3-K) сигнальних шляхів [78, 80]. Ras/MAPK сигналізація також індукує експресію ТФР β 1, яка може додатково посилюватися самим ТФР β шляхом. Цим явищем можна пояснити досить часте зростання експресії ТФР β 1 у ракових клітинах [81]. Оскільки внаслідок Ras-сигналізації індукується експресія урокінази і наступне утворення плазміну, а також активується експресія протеази клітинної поверхні MMP-1 [82], то Ras/MAPK шлях може посилювати клітинно-автономні ефекти ТФР β 1 і наслідки активації ТФР β на мікродовкілля пухлини.

Показано, що Ras шлях також може пригнічувати ТФР β сигналізацію. Виявлено, що MAP кіназа Erk (extracellular signal-regulated kinase) фосфорилує білки Smad2 і Smad3, внаслідок чого пригнічується їхня транслокація у ядро. Цим механізмом можна пояснити, чому у деяких клітинах з гіперактивною Ras-сигналізацією відповіді на дію ТФР β є пригніченими [83]. Проте це питання залишається спірним, оскільки в інших роботах було продемонстровано відсутність порушення ядерної транслокації Smads у Ras-трансформованих клітинах або клітинах з активованою MAP сигналізацією [84]. Нарешті, опосередковане N-термінальною кіназою Jun (JNK) фосфорилування Smad3 сприяє активації та ядерній транслокації останнього [79]. Очевидно, що перехресна взаємодія між шляхами ТФР β і Ras/MAPK залежить від фізіологічного стану клітини, що є звичним явищем для ТФР β сигналізації.

Інші перехресні зв'язки Smad шляху. Для функціонування ТФР β сигналізації у ракових клітинах важливими можуть бути кілька додаткових пере-

хресних взаємозв'язків Smad шляху. Наприклад, сигналізація факторами диференціації Wnt, які регулюють тканинну специфікацію і контроль росту, може перехрещуватися з ТФР β /Smad сигналізацією, оскільки Smad3 здатний безпосередньо взаємодіяти з β -катеніном і LEF/TCF — транскрипційними регуляторами Wnt сигналізації [85]. Ядерні білки, кодовані вірусами, також можуть регулювати Smad-залежну експресію генів, взаємодіючи із Smads на відповідних промоторах. Прикладами є білок Tax, кодований вірусом типу I лейкемії Т-клітин людини (HTLV-1) — потужним репресором Smad-залежної транскрипції [86], і ядерний білок pX вірусу гепатиту В, що посилює Smad-залежну транскрипцію у відповідь на ТФР β [87].

Як наслідок активації деяких сигнальних шляхів, зокрема, активації рецепторів епідермального фактора росту (EGF), передачі сигналів інтерферону- γ через STAT-білки та індукованої фактором некрозу пухлин- α (TNF- α) активації NF- κ B запускається експресія Smad7, який пригнічує ТФР β сигналізацію [88, 89].

Активация Ca²⁺/кальмодулін-залежної протеїнкінази II (CamKII) спричиняє фосфорилування Smad2, Smad3 і Smad4, пригнічує індукований ТФР β імпорт у ядро і транскрипційну активність Smad2, а також впливає на гетеромеризацію Smad білків. Smad2 фосфорилується CamKII кіназою у лінкерному сегменті і MH1 домені. Фосфорилування MH1-доменів Smad2 і Smad3 протеїнкіназою C (PKC), яке унеможливує їхнє зв'язування з ДНК, засвідчує регуляторну роль PKC у Smad-залежній транскрипції. Білок Smad4 у ссавців не регулюється фосфорилуванням, але Smad6 і Smad7 також можуть фосфорилуватися незалежно від ТФР β стимуляції [90].

Smad-незалежна сигналізація. Шляхи, перехресні із Smad сигналізацією, можуть виникати завдяки здатності ТФР β активувати сигнальні шляхи, незалежні від Smad білків. ТФР β може активувати MAP кінази Erk і p38, а також JNK, хоча рівень та кінетика цієї активації різняться залежно від типу або лінії клітин. Кіназа кінази MAP кінази TAK1, яка швидко активується ТФР β , але також причетна до інших сигнальних шляхах, може ініціювати ці сигнальні каскади. Активация MAP кінази p38 і JNK може сприяти Smad сигналізації завдяки фосфорилуванню самих Smad білків або транскрипційних факторів *c-Jun* і ATF-2, які співпрацюють із Smad3 [79, 91, 92].

ТФР β також здатний активувати або стабілізувати малі GTPази RhoA [93] і RhoB [94]. Вони можуть бути залученими до кількох відповідей на ТФР β , зокрема, RhoB є необхідною для активації JNK [79]. Нарешті, ТФР β індукуює взаємодію протеїнфосфатази 2A з S6 кіназою, яка регулює трансляцію білків і контроль росту, послаблюючи активність останньої [95]. Існують також докази активації ТФР β фосфатидилінозитол-3 кінази (PI-3-K) [96]. Хоча механізми активації Smad-незалежних сигнальних каскадів ТФР β і їхні функції потребують кращої характеристики, ці спостереження свідчать про те, що інактивація Smad шляхів не залишає клітину нечутливою до ТФР β .

Висновки. Внутрішньоклітинна передача сигналу лігандів надродини ТФР β забезпечується складною мережею сигнальних білків, зокрема, специфічних рецепторів на поверхні клітини, що мають серин/треонінкіназну активність, і низхідних сигнальних ефекторів — Smad білків, які самостійно або у комплексі з іншими транскрипційними факторами регулюють активність генів-мішеней. Процеси передачі ТФР β сигналу тонко регулюються на багатьох рівнях — від біосинтезу та секреції лігандів до транскрипції генів-мішеней, що забезпечує надзвичайну різноманітність біологічних ефектів ТФР β .

O. V. Fedorenko, R. S. Stoika

Signaling pathway of transforming growth factor β and its regulation

Summary

The review deals with contemporary data concerning structure and function of the ligands, receptors and downstream signaling effectors in the transforming growth factor β (TGF β) signaling pathway. The mechanisms of signal transduction from cellular surface to target genes in the nucleus are discussed, as well as the ways of their regulation and cross-talk with other signaling pathways.

Key words: TGF β , receptors, Smad proteins, signaling pathway.

A. B. Федоренко, Р. С. Стойка

Сигнальный путь трансформирующего фактора роста β и его регуляция

Резюме

Приведены современные данные о структуре и функциях лигандов, рецепторов и нисходящих эффекторных белков сигнального пути трансформирующего фактора роста β . Рассмотрен механизм передачи сигнала на пути от поверхности клетки до генов-мишеней в ядре, способы их регуляции и перекрестные связи с другими сигнальными путями.

Ключевые слова: ТФР β , рецепторы, Smad белки, сигнальный путь.

PERELIK LITERATURY

1. Фильченков А. А., Стойка Р. С., Быкорез А. И. Трансформирующие факторы роста.—К.: Наук. думка, 1994.—288 с.
2. Massague J. TGF β i signal transduction // Annu. Rev. Biochem.—1998.—67.—P. 753—791.
3. De Larco J. E., Todaro G. J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75.—P. 4001—4005.
4. Derynck R., Jarrett J. A., Chen E. Y., Eaton D. H., Bell J. R., Assoian R. K., Roberts A. B., Sporn M. W., Goeddel D. V. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells // Nature.—1985.—316.—P. 701—705.
5. Roberts A. B., Sporn M. W. The transforming growth factor- β s // Peptide Growth Factors and Their Receptors.—Berlin: Springer, 1990.—Pt I.—P. 419—472.
6. Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature.—2001.—409.—P. 860—921.
7. Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF β signalling from cell membrane to the nucleus // Cell.—2003.—113.—P. 685—700.
8. Massague J., Blain S.W., Lo R. S. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders // Cell.—2000.—103.—P. 295—309.
9. Derynck R., Akhurst R. J., Balmain A. TGF- β signalling in tumor suppression and cancer progression // Nature Genet.—2001.—29.—P. 117—126.
10. Roberts A. B., Sporn M. W. Differential expression of the TGF β isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues // Mol. Reprod. Develop.—1992.—32.—P. 91—98.
11. Roberts A. B., Kim S.-J., Noma T., Glick A. B., Lafyatis R., Lechleider R., Jakowlew S. B., Geiser A., O'Reilly M. A., Danielpour D. Multiple forms of TGF- β : Distinct promoters and differential expression // Ciba Found. Symp.—1991.—157.—P. 7—28.
12. Gaddy-Kurten D., Tsuchida K., Vale W. Activins and the receptor serine kinase superfamily // Recent Progr. Hormone Res.—1995.—50.—P. 109—129.
13. Spencer F. A., Hoffmann F. M., Gelbart W. M. Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster* // Cell.—1982.—28.—P. 451—461.
14. Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitscock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M., Wang E. A. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities // Science.—1988.—242.—P. 1528—1534.
15. Padgett R. W., Wozney J. M., Gelbart W. M. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90.—P. 2905—2909.
16. Hogan B. L. M. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development // Genes Develop.—1996.—10.—P. 1580—1594.
17. Massague J., Weis-Garcia F. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals // Cancer Surv.—1996.—27.—P. 41—64.
18. Miyazono K., Ichijo H., Heldin C.-H. Transforming growth factor- β : latent forms, binding proteins and receptors // Growth Factors.—1993.—8.—P. 11—22.
19. Sun P. D., Davies D. R. The cysteine-knot growth-factor

- superfamily // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*—1995.—2.—P. 269—291.
20. Munger J. S., Harpel J. G., Gleizes P. E., Mazziery R., Nunes I., Rifkin D. B. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation // *Kidney Int.*—1997.—51.—P. 1376—1382.
 21. Munger J. S., Harpel J. G., Giancotti F. G., Rifkin D. B. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin $\alpha\beta_1$ // *Mol. Biol. Cell.*—1998.—9.—P. 2627—2638.
 22. Grawford S. E., Steumach V., Murphy-Ullrich J. E., Ribeiro S. M., Lawler J., Hynes R. O., Boivin G. P., Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo // *Cell.*—1998.—93.—P. 1159—1170.
 23. Yu Q., Stamenkovic I. Cell-surface localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF β and promotes tumor invasion and tumorigenesis // *Genes Develop.*—2000.—14.—P. 163—176.
 24. Yamaguchi Y., Mann D. M., Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin // *Nature.*—1990.—346.—P. 281—284.
 25. Mather J. P. Follistatins and α 2-macroglobulin are soluble binding proteins for inhibin and activin // *Hormone Res.*—1996.—45.—P. 207—210.
 26. Massague J., Attisano L., Wrana J. L. The TGF- β family and its composite receptors // *Trends Cell. Biol.*—1994.—4.—P. 172—178.
 27. Barbara N. P., Wrana J. L., Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 584—594.
 28. Franzen P., ten Dijke P., Ichijo H., Yamashita H., Schulz P., Heldin C. H., Miyazono K. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex // *Cell.*—1993.—75.—P. 681—692.
 29. Lin H. Y., Wang X.-F., Ng-Eaton E., Weinberg R. A., Lodish H. F. Expression cloning of the TGF beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase // *Cell.*—1992.—68.—P. 775—785.
 30. Heldin C.-H., Miyazono K., ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins // *Nature.*—1997.—390.—P. 465—471.
 31. Roberts A., Derynck R. Signaling schemes for TGF- β // A review of the meeting «The TGF- β Superfamily: Signaling and Development»: FASEB Summer Res. Conf.—Tucson, 2001.—P. 1—6.
 32. Souchelnytskyi S., ten Dijke P., Miyazono K., Heldin C.-H. Phosphorylation of Ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses // *EMBO J.*—1996.—15.—P. 6231—6240.
 33. Wang T., Donahoe P. K., Zervos A. S. Specific interaction of type I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12 // *Science.*—1994.—265.—P. 674—676.
 34. Mathews L. S., Vale W. W. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase // *Cell.*—1991.—65.—P. 973—982.
 35. Yamashita H., ten Dijke P., Franzen P., Miyazono K., Heldin C.-H. Formation of heterooligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 20172—20178.
 36. Brown C. B., Boyer A. S., Runyan R. B., Barnett J. V. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart // *Science.*—1999.—283.—P. 2080—2082.
 37. Datta P. K., Chytil A., Gorska A. E., Moses H. L. Identification of STRAP, a novel WD domain protein in transforming growth factor- β signaling // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 34671—34674.
 38. Choy L., Derynck R. The type II transforming growth factor (TGF)-receptor interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF- β response // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 31455—31462.
 39. Di Guglielmo G. M., Le Roy C., Davidson A. F., Wrana J. L. Distinct endocytic pathways regulate TGF β receptor signaling and turnover // *Nat. Cell Biol.*—2003.—5.—P. 410—421.
 40. Sekelsky J. J., Newfeld S. J., Rafferty L. A., Chartoff E. H., Gelbart W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster* // *Genetics.*—1995.—139.—P. 1347—1358.
 41. Derynck R., Gelbart W. M., Harland R. M., Heldin C.-H., Kern S. E., Massague J., Melton D. A., Mlodzik M., Padgett R. W., Roberts A. B., Smith J., Thomsen G. H., Vogelstein B., Wang X.-F. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF β family signals // *Cell.*—1996.—87.—P. 173—178.
 42. Itoh S., Itoh F., Goumans M.-J., ten Dijke P. Signalling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins // *Eur. J. Biochem.*—2000.—267.—P. 6954—6967.
 43. Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.-H. Smad regulation in TGF- β signal transduction // *J. Cell. Sci.*—2001.—114.—P. 4359—4369.
 44. Attisano L., Lee-Hoeflich S. T. The Smads // *Genome Biol.*—2001.—2.—P. 3010.1—3010.8.
 45. Zhang Y., Musci T., Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function // *Curr. Biol.*—1997.—7.—P. 270—276.
 46. Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A., Jr., Wrana J. L., Falb D. The MAD related protein Smad7 associates with the TGF beta receptor and functions as an antagonist of TGF beta signaling // *Cell.*—1997.—89.—P. 1165—1173.
 47. Hata A., Lo R. S., Wotton D., Lagna G., Massague J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4 // *Nature.*—1997.—388.—P. 82—87.
 48. Kavsak P., Rasmussen R. K., Causing C. G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G. H., Wrana J. L. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation // *Mol. Cell.*—2000.—6.—P. 1365—1375.
 49. Tsukazaki T., Chiang T. A., Davison A. F., Attisano L., Wrana J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor // *Cell.*—1998.—95.—P. 779—791.
 50. Souchelnytskyi S., Tamaki K., Engström U., Wernstedt C., ten Dijke P., Heldin C.-H. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C-terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for TGF- β signalling // *J. Biol. Chem.*—1997.—272.—P. 28107—28115.
 51. Inman G. J., Nicolas G. J., Hill C. S. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity // *Mol. Cell.*—2002.—10.—P. 283—294.
 52. Xu L., Kang Y., Col S., Massague J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF- β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus // *Mol. Cell.*—2002.—10.—P. 271—282.
 53. Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J.

- L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N. E., Heldin C. H., ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF-beta-inducible antagonist of TGF-beta signaling // *Nature*.—1997.—389.—P. 631—635.
54. Itoh S., Landstrom M., Hermansson A., Itoh F., Heldin C.-H., Heldin N.-E., ten Dijke P. Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7 // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 29195—29201.
 55. Datta P. K., Moses H. L. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor β signaling // *Mol. Cell. Biol.*—2000.—20.—P. 3157—3167.
 56. Nagarajan R. P., Zhang J., Li W., Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4 // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 33412—33418.
 57. Gronroos E., Hellman U., Heldin C. H., Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination // *Mol. Cell.*—2002.—10.—P. 483—493.
 58. Zhu H., Kavsak P., Abdollah S., Wrana J. L., Thomsen G. H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation // *Nature*.—1999.—400.—P. 687—693.
 59. Heldin C.-H., ten Dijke P. Smad destruction turns off signalling // *Nature Cell Biol.*—1999.—1.—P. E195—E197.
 60. Alevizopoulos A., Mermoud N. Transforming growth factor- β : the breaking open of a black box // *BioEssays*.—1997.—19.—P. 581—591.
 61. Ten Dijke P., Miyazono K., Heldin C.-H. Signalling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signalling // *TIBS*.—2000.—25.—P. 64—70.
 62. Dennler S., Itoh S., Vivien D., ten Dijke P., Huet S., Gauthier J.-M. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF- β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor type 1 gene // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 3091—3100.
 63. Shi Y., Wang Y.-F., Jayaraman L., Yang H., Massague J., Pavletich N. P. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling // *Cell*.—1998.—94.—P. 585—594.
 64. Feng X. H., Zhang Y., Wu R. Y., Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation // *Genes Develop.*—1998.—12.—P. 2153—2163.
 65. Yahata T., de Caestecker M. P., Lechleider R. J., Andriole S., Roberts A. B., Isselbacher K. J., Shioda T. The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 8825—8834.
 66. Kim R. H., Wang D., Tsang M., Martin J., Huff C., de Caestecker M. P., Parks W. T., Meng X., Lechleider R. J., Wang T., Roberts A. B. A novel Smad nuclear interacting protein (SNIP1) suppresses p300-dependent TGF- β signal transduction // *Genes Develop.*—2000.—14.—P. 1605—1616.
 67. Wotton D., Lo R. S., Lee S., Massague J. A Smad transcriptional corepressor // *Cell*.—1999.—97.—P. 29—39.
 68. Luo K., Stroschein S. L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S., Zhou Q. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling // *Genes Develop.*—1999.—13.—P. 2196—2206.
 69. Stroschein S. L., Wang W., Zhou S., Zhou Q., Luo K. Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein // *Science*.—1999.—286.—P. 771—774.
 70. Chen X., Weisberg E., Fridmacher V., Watanabe M., Naco G., Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin responsive factor // *Nature*.—1997.—389.—P. 85—89.
 71. McCartney-Francis N. L., Wahl S. M. Transforming growth factor β : a matter of life and death // *J. Leuk. Biol.*—1994.—55.—P. 401—408.
 72. Pietenpol J. A., Stein R. W., Moran E., Yacuk P., Schlegel R., Lyons R. M., Pittelkow R. M., Mungler K., Howley P. M., Moses H. L. TGF- β 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains // *Cell*.—1990.—61.—P. 777—785.
 73. Barlat I., Henglein B., Plet A., Lamb N., Fernandez A., McKenzie F., Poryssegur J., Vie A., Blanchard J. M. TGF β 1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP-responsive element through independent pathways // *Oncogene*.—1995.—11.—P. 1309—1318.
 74. Hannon G. J., Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF- β induced cell cycle arrest // *Nature*.—1994.—371.—P. 257—261.
 75. Datto M. B., Yu Y., Wang X.-F. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter // *J. Biol. Chem.*—1995.—270.—P. 28623—28628.
 76. Li L., Hu J.-S., Olson E. N. Different members of the *jun* protooncogene family exhibit different patterns of expression in response to type β transforming growth factor // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 1556—1562.
 77. Bascom C. C., Wolfshohl J. R., Coffey R. J. Jr., Madisen L., Webb N. R., Purchio A. R., Derynck R., Moses H. L. Complex regulation of transforming growth factor β 1, β 2 and β 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factor β 1 and β 2 // *Mol. Cell. Biol.*—1989.—9.—P. 5508—5515.
 78. Zhang Y., Feng X. H., Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription // *Nature*.—1998.—394.—P. 909—913.
 79. Engel M. E., McDonnell M. A., Law B. K., Moses H. L. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- β -mediated transcription // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 37413—37420.
 80. Peron P., Rahmani M., Zagar Y., Purand-Schneider A. M., Lardeux B., Bernuau D. Potentiation of Smad transactivation by Jun proteins during a combined treatment with epidermal growth factor and transforming growth factor- β in rat hepatocytes. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-induced AP-1 activation // *J. Biol. Chem.*—2001.—276.—P. 10524—10531.
 81. Yue J., Mulder K. M. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor β for transforming growth factor β 1 production in a Smad-dependent pathway // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 30765—30773.
 82. Reddy K. B., Krueger J. S., Kondapaka S. B., Diglio C. A. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells // *Int. J. Cancer*.—1999.—82.—P. 268—273.
 83. Kretzschmar M., Doody J., Timokhina I., Massague J. A mechanism of repression of TGF β /Smad signaling by oncogenic Ras // *Genes Develop.*—1999.—13.—P. 804—816.
 84. Lehmann K., Janda E., Pierreux C., Ryomaa M., Schulze A., McMahon M., Hiu C., Beug H., Downward J. Raf induces TGF β production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells // *Genes Develop.*—2000.—14.—P. 2610—2622.
 85. 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. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 8358—8363.
86. Mori N., Morishita M., Tsukazaki T., Giam C. Z., Kumatori A., Tanaka Y., Yamamoto N. Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax represses Smad-dependent transforming growth factor β signaling through interaction with CREB-binding protein/p300 // *Blood.*—2001.—97.—P. 2137—2144.
87. Lee D. K., Park S. H., Yi Y., Choi S. G., Lee C., Parks W. T., Cho H., de Caestecker M. P., Shaul Y., Roberts A. B., Kim S. J. The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF- β family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis // *Genes Develop.*—2001.—15.—P. 455—466.
88. Ulloa L., Doody J., Massague J. Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- β /STAT pathway // *Nature.*—1999.—397.—P. 710—713.
89. Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A. A., Rojkind M., Bottlinger E. P. A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF- κ B/RelA // *Genes Develop.*—2000.—14.—P. 187—197.
90. Derynck R., Zhang Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling // *Nature.*—2003.—425.—P. 577—584.
91. Mulder K. M. Role of Ras and MAPKs in TGF β signaling // *Cytokine Growth Factor Rev.*—2000.—11.—P. 23—35.
92. Sano Y., Harada J., Tashiro S., Gotoh-Mandeville R., Maekawa T., Ishii S. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor- β signaling // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 8949—8957.
93. Bhowmick N. A., Ghiassi M., Bakin A., Aabve M., Lundquist C. A., Engel M. E., Arteaga C. L., Moses H. L. Transforming growth factor- β 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism // *Mol. Biol. Cell.*—2001.—12.—P. 27—36.
94. Engel M. E., Datta P. K., Moses H. L. RhoB is stabilized by transforming growth factor β and antagonizes transcriptional activation // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 9921—9926.
95. Petritsch C., Beug H., Balmain A., Oft M. TGF- β inhibits p70S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest // *Genes Develop.*—2000.—14.—P. 3093—3101.
96. Bakin A. V., Tomlinson A. K., Bhowmick N. A., Moses H. L., Arteaga C. L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 36803—36810.

УДК 577.218

Надійшла до редакції 25.10.04