

EpH4 세포에서 TGF- β 에 의한 세포사멸시 Smad 단백질에 의존한 *Gadd45b* 유전자의 발현 변화

조희준 · 유지윤*

경상대학교 자연과학대학 미생물학전공/생명과학연구원

Received January 28, 2008 / Accepted March 24, 2008

Smad-dependent Expression of *Gadd45b* Gene during TGF- β -induced Apoptosis in EpH4 Cells. Hee Jun Cho and Jiyun Yoo*. *Department of Microbiology/Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea* - Transforming growth factor- β (TGF- β)-dependent apoptosis is important in the elimination of damaged or abnormal cells from normal tissues *in vivo*. *Gadd45b* has been known to participate in TGF- β -induced apoptosis by the activation of p38 kinase. In this report, we show that *Gadd45b* is an immediate-early response gene for TGF- β during apoptosis in EpH4 cells. To elucidate the molecular mechanism of TGF- β -induced *Gadd45b* gene expression, we cloned the 5'-flanking region of the mouse *Gadd45b* gene. When transfected into EpH4 cells, this 5'-flanking region conferred promoter activity and inducibility by TGF- β . Deletion analyses demonstrated that the minimal promoter activity was detected in the proximal region 220 bp upstream of the transcription initiation site. We also found that the proximal *Gadd45b* promoter is activated by TGF- β through the action of Smad2, Smad3, and Smad4. Finally, we show that the expression of *Gadd45b* gene by TGF- β is suppressed in EpRas cells in which TGF- β could not induce apoptosis, suggesting that *Gadd45b* may be a crucial target for TGF- β -induced apoptosis in EpH4 cells.

Key words : Apoptosis, EpH4, EpRas, *Gadd45b*, transforming growth factor- β (TGF- β)

서 론

여러 조직에서 세포의 수는 세포의 성장과 세포사멸에 의해 정교하게 조절되고 있다. 세포의 성장과 세포사멸의 정확한 조절은 정상적인 세포의 형태 유지에 필수적이며, 만약 이들 간의 균형이 깨어지면 암세포로 변형되기도 한다. Transforming growth factor- β (TGF- β)는 세포의 성장을 억제하거나 세포사멸을 유도하는 여러 가지 유전자들의 발현을 조절하여 세포내에서 다양한 기능을 가지는 단백질이다 [1,2]. TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정은 생체내의 정상조직에서 손상을 입은 세포들을 제거하는데 중요한 역할을 한다. 예를 들면, TGF- β 는 인체 내에서 간의 크기를 조절하는데 중요한 기능을 담당하고 있으며, 간세포에서 과발현될 경우 세포사멸을 유도하게 된다[3-5].

TGF- β 에 의한 신호전달 과정은 type I과 type II serine/threonine kinase로 이루어진 heteromeric receptor complex에 의해 전달된다. TGF- β 가 type II receptor kinase에 결합하면 활성화된 type II receptor kinase가 type I kinase를 인산화 시켜 활성화 시키고, TGF- β 신호전달 과정의 세포질 내 신호전달 단백질인 Smad2와 Smad3 단백질이 인산화되어 활성화된다. Receptor에 의해 활성화된 Smad2와 Smad3

단백질은 Smad4와 결합하게 되고 핵 내로 이동하게 되며, 핵 내에서 다른 transcription factor와의 상호 작용을 통해 여러 가지 유전자들의 발현을 조절하게 된다[6-9]. 현재까지 TGF- β 에 관한 연구는 TGF- β 에 의해 유도되는 여러 가지 현상 가운데 세포주기를 억제하는 기작에 치중되어 왔으며, 상대적으로 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸은 잘 알려져 있기는 하지만 그 작용기작에 관한 연구는 아직 미진한 상황이다. 현재까지 알려진 바로는 oxidative stress의 증가, Bcl-2 family 유전자들의 발현 억제, Bax와 같은 세포사멸 촉진 유전자들의 발현 증가와 여러 가지 caspase 단백질들의 활성화 등이 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 담당한다는 것이 알려져 있다[10-16]. 최근에 여러 가지 세포내 신호전달 단백질들이 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸에 관여한다는 보고들이 나오고 있지만 아직까지 그 자세한 작용기작은 알려져 있지 않다[17-20].

*Gadd45b*는 stress나 여러 가지 cytokine에 의해 발현이 유도되는 *Gadd45* family 단백질의 하나로서, 본 연구자가 이전에 발표하였던 연구결과에 의하면 TGF- β 에 의해 유도되는 간세포의 세포사멸 과정에서 발현이 증가한다고 알려져 있다[21]. 특히 *Gadd45b* 단백질은 세포사멸을 촉진하는데 중요한 역할을 담당하는 p38 kinase의 upstream kinase인 MTK1 (also known as MEKK4)과 결합하여 MTK1을 활성화 시키게 되고 궁극적으로 p38 kinase를 활성화시켜 TGF- β 에 의한 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[21,22]. 본 연

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5947, Fax : +82-55-759-5199

E-mail : yooj@gnu.ac.kr

구에서는 TGF- β 에 의해 세포사멸이 유도된다고 알려져 있는 EpH4 세포에서 *Gadd45b* 유전자의 발현 변화를 관찰함으로써 TGF- β 에 의해 유도되는 EpH4 세포의 세포사멸 과정에서 *Gadd45b* 유전자의 기능을 알아보려고 하였다. 또한 *ras* 유전자가 발현되어 TGF- β 에 의한 세포사멸이 억제되는 EpRas 세포에서는[23] TGF- β 에 의한 *Gadd45b* 유전자의 발현이 EpH4 세포에 비해 억제됨을 확인하였다.

재료 및 방법

세포 배양

EpH4와 *ras* oncogene이 과발현되도록 transfection하여 제작된 EpRas 세포를[24] Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 10% FBS, penicillin G, streptomycin sulfate, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 이용하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 키웠다. EpH4 세포는 쥐의 유선 상피세포이며, EpRas 세포는 EpH4 세포에 *ras* 유전자를 발현시킨 세포로서 Martin Oft 박사(Onyx Pharmaceuticals, California, USA)로부터 제공받아 본 실험에 사용하였다.

Apoptosis assay

EpH4 세포의 사멸을 관찰하기 위해 DNA의 internucleosomal fragmentation을 detection하는 cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 사용하였다. TGF- β (5 ng/ml, R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA)를 처리한 EpH4 세포로부터 각 시간마다 cell lysate를 추출하고 cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)와 반응시킨 후 ELISA reader (Bio-Rad Model 550 Microplate Reader, USA)를 이용하여 세포의 사멸 정도를 측정하였다.

RNA 추출 및 Northern blot analysis

TGF- β 를 처리한 EpH4 세포와 EpRas 세포로부터 total RNA를 RNeasy kit (QIAGEN Inc. Germany)를 이용하여 추출하고, 추출한 RNA는 A₂₆₀에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 추출한 RNA 10 μ g을 formaldehyde-agarose gel에 전기영동하고, nylon filter로 옮긴 후 α -³²P로 label된 *Gadd45* 유전자를 probe로 사용하여 hybridization을 수행하였다. nylon filter를 SSC/SDS solution으로 세 번 씻은 후 autoradiography를 통해 *Gadd45b* 유전자의 발현을 확인하였다.

Deletion mutants 제조 및 promoter 분석

Mouse *Gadd45b* 유전자의 promoter 부위 4,730 base pair를 pGL3-Basic vector (Promega, Madison, WI, USA)에 cloning 하고 그 염기서열은 sequencing을 통해 확인하였다[21]. 여러 세트의 primer를 설계한 후 PCR을 이용하여 여러 종류의 de-

letion mutants를 제작하였다[21]. Promoter activity를 측정하기 위해서 reporter 유전자로 사용하는 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase 활성을 측정하기 위해 2.0 \times 10⁵ 개의 세포를 6-well plate에 분주하고, 24시간 후에 각각의 mutant들을 fuge 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 transfection 시킨 다음 약 40시간 후에 Dual Luciferase Reporter Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 각 세포들의 luciferase 활성을 측정하였다.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

TGF- β 를 처리한 EpH4 세포로부터 nuclear extract를 추출한 후[25], 10 μ g의 nuclear extract를 *Gadd45b* promoter의 +5에서 +35사이의 sequence를 합성하여 γ -³²P로 label한 probe (Fig. 3A)와 반응시켰다. Competition 실험을 위해 label 되지 않은 probe와 동일한 oligonucleotide를 probe의 양에 비해 100배 첨가하였으며, probe를 넣기 전에 nuclear extract와 반응시켰다. 반응액을 5% polyacrylamide gel에 전기영동 시키고, autoradiography로 probe에 binding함을 확인하였다.

결과 및 고찰

EpH4 세포에서 TGF- β 에 의한 세포사멸 과정동안 *Gadd45b*의 발현 변화

TGF- β 는 여러 종류의 세포에서 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. EpH4 세포는 쥐의 유선 상피세포로서 전형적인 상피세포의 모습을 갖추고 있으며, TGF- β 에 의해 세포사멸이 유도된다는 것이 알려져 있다[23]. *Gadd45b*는 쥐의 간 세포에서 TGF- β 에 의해 발현이 증가되며, p38 kinase를 activation시켜 TGF- β 에 의한 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다[21]. 본 연구에서는 TGF- β 에 의해 세포사멸이 유도된다고 알려져 있는 EpH4 세포에서 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정동안 *Gadd45b* 유전자의 발현 변화를 관찰하였다. EpH4 세포에 TGF- β 를 처리하였을 때 이전의 보고[23]와 마찬가지로 약 8시간 정도부터 세포사멸을 관찰할 수 있었으며, 24시간 후에는 거의 모든 세포가 사멸됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A and 1B). TGF- β 에 의해 세포사멸이 일어나는 동안 *Gadd45b* 유전자의 발현을 Northern blot analysis로 관찰한 결과 TGF- β 처리 후 30분부터 그 발현이 증가하여 1시간 후에는 최고점에 이르고 그 이후에는 점차 감소함을 알 수 있었다(Fig. 1C).

Gadd45 유전자의 promoter study

TGF- β 에 의해 유도되는 *Gadd45b* 유전자의 발현 증가가 RNA polymerase에 의한 transcription의 증가로부터 유래하는지 확인하기 위해, 이전의 연구에서 *Gadd45b* 유전자의 promoter 부분을 promoter가 없는 luciferase reporter 유전

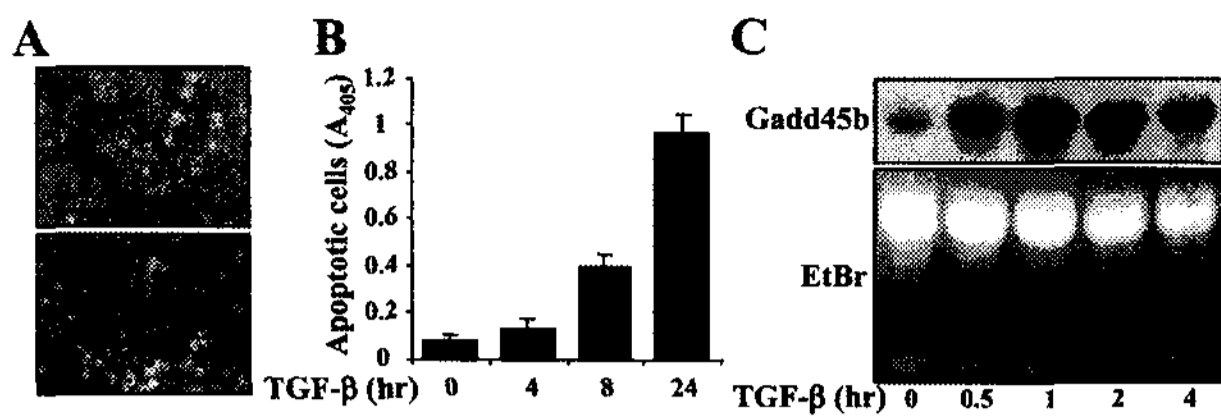


Fig. 1. Upregulation of Gadd45b expression during TGF- β -induced apoptosis in EpH4 cells. Induction of apoptosis in EpH4 cells by TGF- β was verified by cell morphology with light microscopy. Magnification, $\times 200$. (A) and cell death detection ELISA (B). (C) Northern blot analysis of Gadd45b RNA expression in EpH4 cells stimulated with TGF- β for the indicated times.

자의 upstream에 cloning한 construct [21]를 이용하여 그 activity를 확인하였다. EpH4 세포에서 *Gadd45b*의 promoter activity는 TGF- β 에 의해 약 6배 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2A). TGF- β 에 의한 *Gadd45b* 유전자의 promoter activity 증가에 필수적인 promoter sequence를 알아보기 위하여 여러 가지 5'-deletion mutants를 제조하였으며, 각각의 mutants들의 promoter activity를 확인하였다. 여러 가지 5'-deletion mutants 가운데 *Gadd45b* 유전자의 transcription start site로부터 220 base upstream을 포함하는 mutants들은 모두 TGF- β 에 의해 promoter activity가 증가하였지만, 100 base upstream까지 deletion 시켰을 경우 그 activity가 증가하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 -220 base부터 -100 base 사이의 서열에 TGF- β 에 의한 *Gadd45b* promoter activity의 증가에 필수적인 transcription factor가 binding함을 의미하는 것이다.

TGF- β 의 신호전달 과정에는 여러 가지 신호전달 단백질들이 관여하지만 특히 Smad 단백질들이 중요한 기능을 담

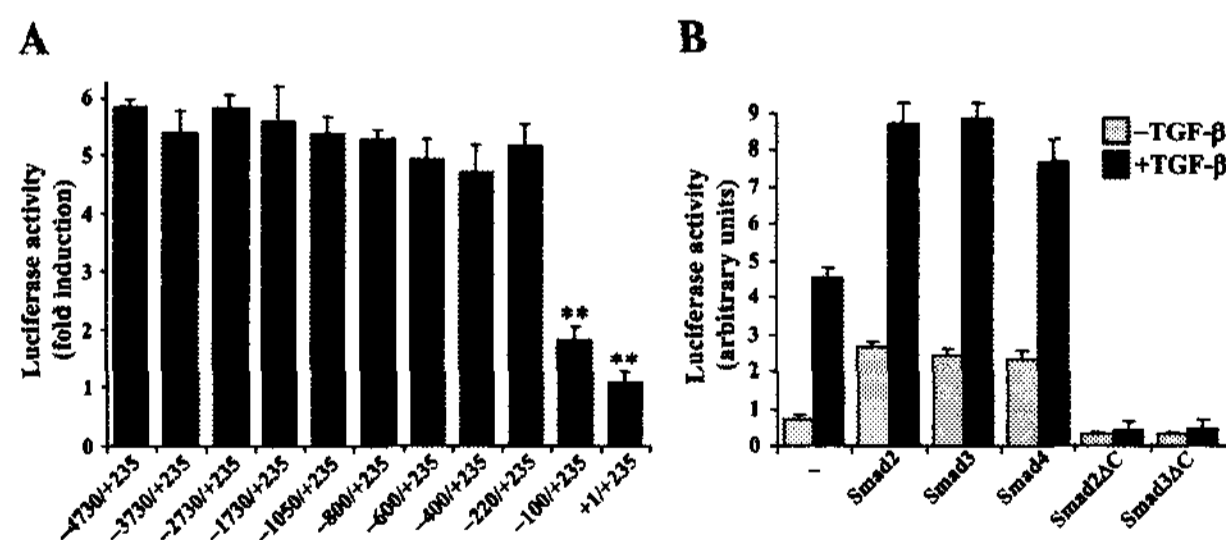


Fig. 2. TGF- β -induced transcription of Gadd45 requires Smad2, Smad3, and Smad4. (A) Serial deletion mutants of Gadd45b promoter constructs were transfected into EpH4 cells, untreated or treated with TGF- β , and assessed for luciferase activity. (B) EpH4 cells were transfected with -220/+235 Gadd45b promoter construct and various Smad expression plasmids as indicated. Cells were then stimulated with TGF- β and assessed for luciferase activity.

당한다는 것이 잘 알려져 있다[6-9]. TGF- β 에 의한 *Gadd45b* promoter activity의 증가에 TGF- β 의 신호 전달에 중요한 역할을 담당하는 Smad 단백질들이 관여하는지 확인하기 위해, Smad 단백질들을 발현시키고 TGF- β 에 의한 *Gadd45b* 유전자의 promoter activity를 측정하였다. TGF- β 에 의해 activity가 증가하는 가장 작은 promoter 부위를 포함하는 -220/+235 mutants를 Smad2, 3, 4를 발현하는 vector [21]와 함께 각각 transfection 시키면 TGF- β 를 처리하지 않아도 그 promoter activity가 약 3배정도 증가함을 관찰할 수 있었으며, TGF- β 는 이들의 activity를 더욱 향상시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 또한 Smad 단백질의 활성화에 필수적인 (TGF- β 의 type I kinase에 의해 인산화 되는) 부위인 C-terminal domain이 제거된 dominant negative form의 Smad2와 Smad3를 발현하는 vector (Smad2 Δ C와 Smad3 Δ C) [21]를 이용하여 Smad2와 Smad3의 기능을 억제하였을 때 TGF- β 에 의한 *Gadd45b*의 promoter activity가 증가하지 않음을 관찰하였다(Fig. 2B). 이러한 결과는 Smad2와 Smad3가 TGF- β 에 의한 *Gadd45b*의 promoter activity의 증가에 필수적인 역할을 한다는 것을 의미하는 것이다.

Gadd45b 유전자의 promoter sequence를 분석해본 결과 *Gadd45b* 유전자의 transcription start site를 +1로 하였을 때 [26], +12에서 +16과 +25에서 +31사이의 sequence에 Smad 단백질이 binding할 수 있는 서열이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3A). 이런 서열에 Smad 단백질이 binding하는지 확인하기 위해 +5에서 +35사이의 sequence를 probe로 하여 electrophoresis mobility shift assay (EMSA)를 수행한 결과, Smad 단백질이 TGF- β 를 처리하였을 때 이 서열에 binding함을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 하지만 앞의 실험에서 *Gadd45b*의 promoter activity에 중요할 것으로 예측되었던 -220 base부터 -100 base 사이의 sequence에는 Smad 단백질이 binding할 수 있는 서열이 존재하지 않았으며, 실제로 이 부분의 서열을 probe로 하여 EMSA를 수행하였으나 TGF- β 에 의한 새로운 단백질의 binding은 관찰할 수 없었다(data not shown). Smad 단백질은 transcription factor로서 그 자체로 유전자의 발현을 조절하기도 하지만, 많은 보고에서 Sp1이나 AP-1과 같은 다른 transcription factor들과 함께 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다[27-30]. 이와 같은 결과를 종합하여볼 때, EpH4 세포에서 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정 동안 *Gadd45b* 유전자가 발현되기 위해서는 TGF- β 에 의해 활성화된 Smad 단백질이 *Gadd45b* promoter의 -220 base와 -100 base 사이에 binding 되어 있는 다른 transcription factor와 함께 작용할 가능성이 높다고 생각된다. 실제로 *Gadd45b* promoter의 -220 base와 -100 base 사이의 서열에는 Sp1이 binding할 수 있는 GC box가 존재하는데(Fig. 3A)[26], Sp1과 Smad 단백질간의 interaction이나 이 서열의 중요성에 관한 실험이 추가로 수행되어야 할 것이다.

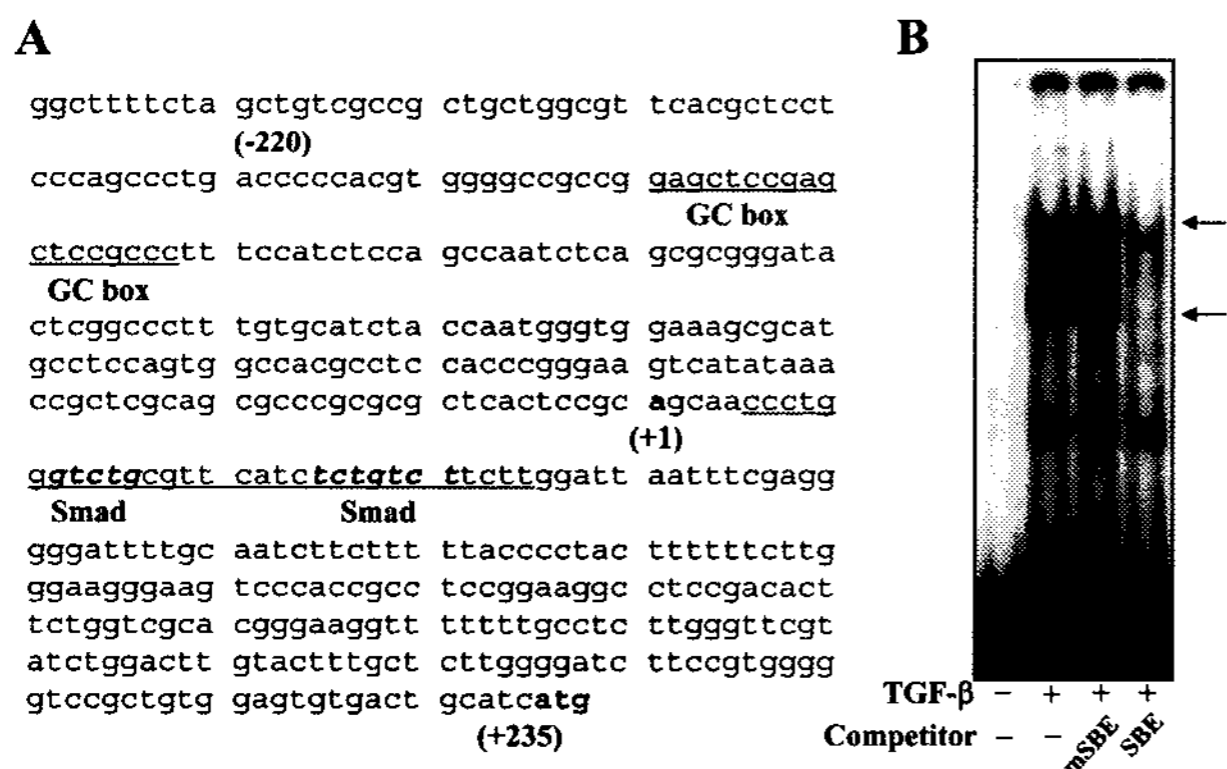


Fig. 3. Binding of Smad proteins in the Gadd45b promoter. (A) Shown is the 468 nt sequence, which contains 230 nt of the 5'-flanking region and 238 nt of the first exon (235 nt of 5' untranslated region and 3 nt of coding sequence). Nucleotide numbering starts at the transcription start site (+1). Sequences of Smad binding element are indicated. (B) EMSA was performed with 10 μg of EpH4 nuclear extract and the labelled Smad binding element (SBE) probe. Two-specific DNA-protein complexes (indicated by arrows) were formed when the labelled SBE probe was used. Competition analysis was performed in the presence of an 100-fold molar excess of unlabelled mutant SBE (mSBE) or SBE oligonucleotide.

Ras에 의해 transformation된 세포에서 Gadd45b의 발현 변화

EpRas 세포는 EpH4 세포에 *ras* 유전자를 도입시켜 암세포화된 세포로서[24], TGF-β에 의한 세포사멸이 유도되지 않는다고 알려져 있는 세포이다[23]. EpRas 세포의 경우 *ras* 유전자의 발현에 의해 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway가 활성화 되며, PI3K의 활성화가 TGF-β에 의한 세포사멸을 억제하는데 중요하다는 것이 알려져 있다[23]. 이 세포에서 TGF-β에 의한 Gadd45b 유전자의 발현을 확인한 결과 EpH4 세포에 비해 TGF-β에 의한 발현 증가가 현저히 감소하였음을 확인하였다(Fig. 4A). 또한 EpRas 세포에서 TGF-β에 의한 Gadd45b 유전자의 promoter activity도 EpH4 세포에 비해 현저히 감소함을 확인하였다(Fig. 4B). 이러한 결과는 Ras의 발현에 의해 TGF-β에 의한 Gadd45b의 유전자의 발현이 억제되어 EpRas 세포에서 TGF-β에 의한 세포사멸이 억제되었을 가능성을 시사하는 것이다. 향후에는 어떠한 기작으로 *ras* 유전자가 Gadd45b 유전자의 발현에 영향을 미치는지 확인하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

Transforming growth factor-β (TGF-β)에 의해 유도되는 세포사멸 과정은 정상 조직에서 손상 받은 조직이나 비정상

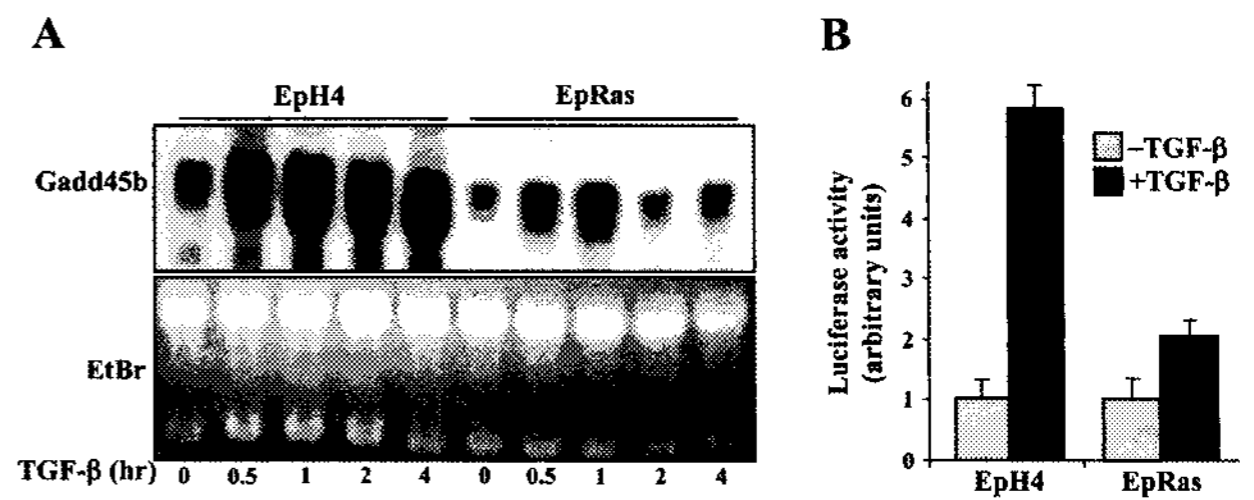


Fig. 4. Expression of Gadd45b in EpH4 and EpRas cells. (A) Northern blot analysis of Gadd45b RNA expression in EpH4 and EpRas cells stimulated with TGF-β for the indicated times. (B) EpH4 and EpRas cells those are transfected with -220/+235 Gadd45b promoter construct were stimulated with TGF-β, and assessed for luciferase activity.

적인 조직을 제거하는데 중요한 역할을 담당한다. Gadd45b는 p38 kinase를 활성화시킴으로 TGF-β에 의해 유도되는 세포사멸 과정을 매개한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 TGF-β에 의해 세포사멸이 일어나는 EpH4 세포에서 Gadd45b 유전자의 발현이 TGF-β에 의해 촉진됨을 보여주었다. 어떠한 기작으로 TGF-β에 의해 Gadd45b 유전자의 발현이 촉진되는지 알아보기 위해 Gadd45b 유전자의 5'-flanking region을 cloning하였으며, EpH4 세포에서 TGF-β에 의해 그 promoter activity가 증가함을 확인하였다. 여러 가지 deletion mutants를 제조하여 promoter activity를 조사한 결과 전사 개시점으로부터 220 bp upstream 부위에 promoter activity에 필수적인 sequence가 존재함을 확인하였다. 또한 TGF-β에 의한 Gadd45b 유전자의 promoter activity에 Smad2, Smad3, 그리고 Smad4가 중요한 기능을 담당함도 확인하였다. 마지막으로 *ras* 유전자가 도입되어 TGF-β에 의한 세포사멸이 억제되어있는 EpRas 세포에서 TGF-β에 의한 Gadd45b 유전자의 발현을 확인한 결과 EpRas 세포에서 TGF-β에 의한 Gadd45b 유전자의 발현이 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Gadd45b 유전자가 EpH4 세포에서 TGF-β에 의한 세포사멸을 유도하는데 중요한 기능을 담당할 가능성이 높음을 의미하는 것이다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었습니다(KRF-2005-003-C00140).

References

1. Haufel, T., S. Dormann, J. Hanusch, A. Schwieger and G. Bauer. 1999. Three distinct roles for TGF-beta during intercellular induction of apoptosis: a review. *Anticancer Res.*

- 19, 105-111.
2. Hsing, A. Y., K. Kadomatsu, M. J. Bonham and D. Danielpour. 1996. Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Res.* **56**, 5146-5149.
 3. Lin, J. K. and C. K. Chou. 1992. *In vivo* apoptosis in the human hepatoma-cell line induced by transforming growth factor-beta1. *Cancer Res.* **52**, 385-388.
 4. Fukuda, K., M. Kojiro and J. F. Chiu. 1993. Induction of apoptosis by transforming growth factor-beta 1 in the rat hepatoma cell line McA-RH7777: a possible association with tissue transglutaminase expression. *Hepatology* **18**, 945-953.
 5. Oberhammer, F., W. Bursch, R. Tiefenbacher, G. Froschl, M. Pavelka, T. Purchio and R. Schulte-Hermann. 1993. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* **18**, 1238-1246.
 6. Attisano, L. and J. L. Wrana. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 235-243.
 7. Massague, J. and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745-1754.
 8. ten Dijke, P., K. Miyazono and C. H. Heldin. 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-b signaling. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 64-70.
 9. Zhang, Y. and R. Derynck. 1999. Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol.* **9**, 274-279.
 10. Sanchez, A., A. M. Alvarez, M. Benito and I. Fabregat. 1996. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* **271**, 7416-7422.
 11. Koseki, T., K. Yamato, S. Krajewski, J. C. Reed, Y. Tsujimoto and T. Nishihara. 1995. Activin A-induced apoptosis is suppressed by BCL-2. *FEBS Lett.* **376**, 247-250.
 12. Saltzman, A., R. Munro, G. Searfoss, C. Franks, M. Jaye and Y. Ivashchenko. 1998. Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation. *Exp. Cell Res.* **242**, 244-254.
 13. Selvakumaran, M., H. K. Lin, R. T. Sjin, J. C. Reed, D. A. Liebermann and B. Hoffman. 1994. The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor beta 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2352-2360.
 14. Yamamoto, M., K. Fukuda, N. Miura, R. Suzuki, T. Kido and Y. Komatsu. 1998. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* **27**, 959-966.
 15. Fukuchi, Y., M. Kizaki, K. Yamato, C. Kawamura, A. Umezawa, Ji. Hata, T. Nishihara and Y. Ikeda. 2001. Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene* **20**, 704-713.
 16. Chen, R. H. and T. Y. Chang. 1997. Involvement of caspase family proteases in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *Cell Growth Differ.* **8**, 821-827.
 17. Jang, C. W., C. H. Chen, C. C. Chen, J. Y. Chen, Y. H. Su and R. H. Chen. 2002. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* **4**, 51-58.
 18. Larisch, S., Y. Yi, R. Lotan, H. Kerner, S. Eimeri, W. Tony Parks, Y. Gottfried, S. Birkey Reffey, M. P. de Caestecker, D. Danielpour, N. Book-Melamed, R. Timberg, C, S. Duckett, R, J. Lechleider, H. Steller, J. Orly, S. J. Kim and A. B. Roberts. 2000. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* **2**, 915-921.
 19. Perlman, R., W. P. Schiemann, M. W. Brooks, H. F. Lodish and R. A. Weinberg. 2001. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 708-714.
 20. Valderrama-Carvajal, H., E. Cocolakis, A. Lacerte, E. H. Lee, G. Krystal, S. Ali and J. J. Lebrun. 2002. Activin/TGF-b induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat. Cell Biol.* **4**, 963-969.
 21. Yoo, J., M. Ghiassi, L. Jirmanova, A. G. Balliet, B. Hoffman, A. J. Fornace Jr., D. A. Liebermann, E. P. Bottinger and A. B. Roberts. 2003. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 43001-43007.
 22. Takekawa, M. and H. A. Saito. 1998. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* **95**, 521-530.
 23. Janda, E., K. Lehmann, I. Killisch, M. Jechlinger, M. Herzig, J. Downward, H. Beug and S. Grünert. 2002. Ras and TGF-beta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* **156**, 299-313.
 24. Oft, M., J. Peli, C. Rudaz, H. Schwarz, H. Beug and E. Reichmann. 1996. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* **10**, 2462-2477.
 25. Yoo, J., M. J. Jeong, B. M. Kwon, M. W. Hur, Y. M. Park and M. Y. Han. 2002. Activation of dynamin I gene expression by Sp1 and Sp3 is required for neuronal differentiation of N1E-115 cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 11904-11909.
 26. Balliet, A. G., K. S. Hatton, B. Hoffman and D. A. Liebermann. 2001. Comparative analysis of the genetic structure and chromosomal location of the murine MyD118 (Gadd45beta) gene. *DNA Cell Biol.* **20**, 239-247.
 27. Liberati, N. T., M. B. Datto, J. P. Frederick, X. Shen, C. Wong, E. M. Rougier-Chapman and X. F. Wang. 1999. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4844-4849.

28. Moustakas, A. and D. Kardassis. 1998. Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6733-6738.
29. Zhang, Y. and R. Derynck. 1999. Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol.* **9**, 274-279.
30. Wong, C., E. M. Rougier-Chapman, J. P. Frederick, M. B. Datto, N. T. Liberati, J. M. Li and X. F. Wang. 1999. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1821-1830.