中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 5 期: 485 ~ 491
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

果蝇 Mad 蛋白 MH2 结构域的晶体结构

王冲, 陈雷, 王乐, 吴嘉炜*

清华大学生物科学与技术系, 生物信息学教育部重点实验室, 北京 100084

* 联系人, E-mail: jiaweiwu@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2009-03-29; 接受日期: 2009-04-01

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB503900 和 2007CB914400)和国家杰出青年科学基金(批准号: 30425005)资助项目

摘要 Decapentaplegic(Dpp)属于转化生长因子 β(Transforming growth factor β, TGF-β)超家族, 在果蝇(*Drosophila*)发育过程中起着调节细胞增殖、分化和胚胎模式化等重要作用. Smad 蛋白家族的成员能够特异性地介导 TGF-β 信号在细胞内的传递. Mother Against Dpp(Mad)是第一个发现的 Smad 蛋白, 本研究解析了其 MH2(mad homology 2)结构域(Mad-MH2)的晶体结构, 分辨率为 2.80 Å, 该结构和已知的哺乳动物 Smad 蛋白的 MH2 结构具有较高的相似性. 未磷酸化的 Mad-MH2 在结晶过程中形成了同源三聚体, 而且在溶液中表现出浓度依赖的寡聚趋势. 结构分析显示, Mad-MH2 同源三聚体的形成主要由 C 末端的 SSVS 序列介导; 进一步体外生化实验表明, 最后两个 Ser 残基的磷酸化可以大大增强 Mad-MH2 的聚合能力. 有意思的是, 一个不对称单位中的同源三聚体中, 只有两个 Mad-MH2 分子的 C 末端具有稳定的空间构象; 通过和 R-Smad/Smad4 异源三聚体结构的比较, 本研究认为 Mad-MH2 同源三聚体中带有柔性 SSVS 末端序列的分子比较容易被 Co-Smad 替代, 进而形成具有生理功能的异源三聚体.

关键词
TGF-β 信号转导
Smad 蛋白家族
MH2 结构域
晶体结构
同源三聚体

转化生长因子 β(transforming growth factor β, TGF-β)信号通路广泛存在于从线虫到哺乳动物的多种物种中, 在调节机体生长发育和细胞增殖、分化、凋亡等方面均有重要作用[1~3]. 在果蝇中, *Decapentaplegic*(*dpp*)基因负责调控包括胚胎的背-腹模式化和中胚层形成等一系列生长发育过程[4]. 大量研究表明, Smad 蛋白家族是目前已知唯一的介导 TGF-β 信号在细胞内转导的蛋白质. 通过对 *dpp* 修饰基因的筛选, 人们发现了第一个 Smad 蛋白——Mother Against Dpp(Mad)[5,6], 并在线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇和哺乳动物等真核细胞生物中相继发现了一系列同源蛋白, 统称为 Smad 蛋白. 这些蛋白按照功能被划分以下 3 大类: Receptor-regulated Smads(R-Smads), Common-mediator Smads(Co-Smads)和 Inhibitory Smads(I-Smads)[7~9].

TGF-β 信号通路按胞外信号分子的不同又可分为 TGF-β/activin 通路和骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)通路. 某个特定的细胞因子与其相应的 I 型和 II 型受体复合物结合后, 可诱导受体的胞内激酶结构域的自磷酸化激活, 进而磷酸化相应的下游 R-Smad 蛋白. BMP 信号由哺乳动物的 Smad1, 5, 8 和果蝇的 Mad 转导, 而 TGF-β/activin 信号由 Smad2, 3 和 DSmad2 介导. 磷酸化的 R-Smad 与 Co-Smad(如哺乳动物的 Smad4 和果蝇的 Medea)结合, 形成异源复合物并进入细胞核, 直接或间接地结合到 DNA 上, 对目的基因进行转录调控. I-Smad (Smad6, 7 和 Dad)则以多种方式抑制 TGF-β 信号的转导[3,9].

引用格式: 王冲, 陈雷, 王乐, 等. 果蝇 Mad 蛋白 MH2 结构域的晶体结构. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(5): 485—491

R-Smad 有两个保守的结构域, 分别为 N 端的 MH1(mad homology 1)和 C 端的 MH2 结构域. MH2 结构域的功能主要包括结合受体、介导 Smad 蛋白的同源或异源寡聚化以及转录激活等; 而 MH1 结构域可以与特定的 DNA 序列结合, 还可负调控 MH2 结构域的功能[3,10]. R-Smad 蛋白 C 末端有一个保守的 SSXS 序列, 其中最后两个 Ser 残基能够被激活的 I 型受体磷酸化[11,12]. 未磷酸化的 R-Smad C 末端处于柔性无序状态, 在晶体结构中没有稳定的空间构象[13,14]; 磷酸化后, R-Smad 可形成稳定的同源三聚体, 或与 Co-Smad 形成功能性的异源三聚体[15~18].

为了解果蝇 Smad 蛋白发挥功能的分子基础, 本研究解析了 Mad 蛋白 MH2 结构域(Mad-MH2)的晶体结构, 分辨率为 2.80 Å. 该结构和已知的哺乳动物 Smad 蛋白 MH2 结构具有较高的相似性. 在溶液中, 未磷酸化的 Mad-MH2 在高浓度时具有寡聚化趋势, 而拟磷酸化的突变体 Mad-MH2(DVD)在低浓度时即可形成同源三聚体. 事实上, 未磷酸化的 Mad-MH2 在晶体中形成了对称的三聚体, 与已知的磷酸化的 R-Smad 三聚体结构类似. 结构分析显示, C 末端 SSVS 序列在 Mad 的同源三聚化过程中起着非常重要的作用. 有趣的是, Mad-MH2 三聚体中一个分子的 C 末端处于柔性无序状态, 与功能性异源三聚体中的 Co-Smad 一样没有参与蛋白-蛋白相互作用, 因此认为该分子比较容易被 Co-Smad 替代, 从而形成具有生理功能的异源三聚体.

1 材料与方法

1.1 质粒构建及蛋白纯化

Mad 和 Medea 的 cDNA 均由 Rutgers University 的 Richard W. Padgett 博士提供. Mad-MH2(包含氨基酸残基 215~455), Medea-MH2(512~745)和拟磷酸化的 Mad-MH2(DVD)突变体(C 末端 SVS 序列突变为 DVD)被克隆到表达载体 pGEX-4T-2(Novagen)中; 带有 N 端 GST 标签的目的蛋白可于 23℃在大肠杆菌 BL21(DE3)中过量表达. 可溶蛋白经 Glutatione Sepharose 4B(GE healthcare)亲和柱初步纯化后, GST 标签可用 PreScission™ Protease(GE healthcare)切除, 目的蛋白用离子交换和分子筛(Source-15Q 和 Superdex-200, GE Healthcare)层析进一步纯化. 目的蛋白收集在 10 mmol/L Tris(pH 8.0), 200 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT 的缓冲液中, 保存于−80℃. 野生型 Mad-MH2 蛋白终浓度为 5.35 mg/mL, 直接用于结晶实验.

1.2 分子筛分析实验

蛋白质在溶液中的聚合状态可通过分子筛(Superdex-200, 10/30, GE healthcare)层析法确定. 实验所用缓冲液含 25 mmol/L Tris(pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT; 洗脱流速为 0.5 mL/min; 收集体积为 0.5 mL/管. 所用的分子筛层析柱经分子量标准蛋白校准.

1.3 蛋白晶体生长、数据收集处理、结构解析及模型修正

在 277 K, 将 2 μL Mad-MH2 蛋白和等体积的含 100 mmol/L HEPES(pH 7.5), 15%(体积比)Methanol, 300 mmol/L Na Malonate 的池液混合, 通过悬滴法可获得 Mad-MH2 晶体. 晶体经 4 mol/L Na Formate 脱水处理 15 min 后, 用液氮气流快速冷冻, 在 100 K 用 Rigaku 旋转阳极 X 射线铜靶发生器 MM-007(电压 40 kV, 电流 20 mA, 波长λ=1.5418 Å)在 R-AXIS Ⅳ$^{++}$ image-plate detector(Rigaku)上进行数据收集. 数据使用 HKL-2000 软件包进行处理[19]. 该晶体空间群为 *R*3, 晶胞参数为 a=b=137.3 Å, c=194.4 Å, α=β=90.0°, γ=120.0°, 一个不对称单位中含有 4 个分子. 使用 Phaser 软件利用分子置换法进行结构解析[20], 模型为已知的 Mad-MH2 结构(3DIT)[21]. 使用 PHENIX[22]和 Coot[23]软件对结构进行修正, 最终的 *R* 因子和 free *R* 因子分别为 17.9%和 21.9%. 使用 PROCHECK[24]软件对最终模型进行检查. 数据处理和结构修正的相关参数列于表 1. 结构及其相关参数已提交蛋白质数据库(Protein Data Bank), PDB 号为 3GMJ. 本文中所有结构示意图均由 Pymol 软件(http://www.pymol.org)产生.

2 结果与讨论

2.1 Mad-MH2 晶体结构

Smad 蛋白中 MH1 和 MH2 结构域之间的连接区(linker region)介导了 TGF-β 和其他信号通路之间的联系(cross talk)[3,10]. 有研究表明, 位于连接区内的

表 1 数据收集和结构修正参数

晶体名称	Mad-MH2
空间群	R3
晶胞参数	a=b=137.3 Å c=194.4 Å α=β=90.0° γ=120.0°
一个不对称单位中的分子数	4
数据收集	
光源波长 (Å)	1.5418
分辨率范围 (Å)	50.00~2.80 (2.90~2.80)[c]
收集反射数	162977
独立反射数	33568
冗余度	4.9 (4.8)
平均 I/σ (I)	27.5 (3.0)
R_{merge}[a] (%)	7.1 (63.8)
完整度 (%)	99.7
结构修正	
分辨率 (Å)	22.33~2.80
R_{work} 因子/free R 因子[b] (%)	17.9/21.9
衍射点数(工作/测试集)	31864/1702
键长均方根偏差 (Å)	0.008
键角均方根偏差 (°)	1.090
原子数	
蛋白质原子数	6224
水分子数	24
平均 B 因子 (Å^2)	77.2
Wilson B 因子 (Å^2)	71.0
Ramachandran 图 (%)	
最优区	80.3
额外允许区	16.1
一般允许区	2.2
不允许区	1.4
PDB 号	3GMJ

a) $R_{merge}=\Sigma_h\Sigma_l|I_{ih}-\langle I_h\rangle|/\Sigma_h\Sigma_l\langle I_h\rangle$, $\langle I_h\rangle$是观察到的衍射 h (I_{ih})的平均值; b) R_{work} 因子= $\Sigma(||F_p(\mathrm{obs})|-|F_p(\mathrm{calc})||)/\Sigma|F_p(\mathrm{obs})|$; free R 为修正前选取的 5%不参与修正数据的 R 因子; c)括号中的值为最外壳层的参数.

PY motif 对于 Smad 与含有 WW 结构域的蛋白(如 E3-泛素连接酶 Smurfs)的结合是必不可少的[25]. 因此本实验克隆和纯化了包含 PY motif(222~225)和 MH2 结构域(260~455)的果蝇 Mad 蛋白片段(215~455), 用于结晶实验, 并通过分子置换法解析了分辨率 2.80 Å 的 Mad 三维结构(表 1). 然而, MH2 结构域之前的 40 多个氨基酸残基(215~256)在该晶体结构中没有稳定的空间构象, 说明 Smad 蛋白的连接区和 MH2 结构域之间没有稳定的相互作用. Mad 蛋白的 Mad-MH2 的整体构象和已知的哺乳动物 Smad-MH2 结构非常相似(图 1(A)), 核心部分是一个 β 三明治片层, 一端为 loop-helix 区(包括 L1, L2, L3 loop 和 H1 螺旋), 另一端为三螺旋集束(含 H3, H4, H5 螺旋)[13~18,26~28]. 结构比对表明, 该未磷酸化的果蝇 Mad-MH2 和磷酸化的哺乳动物 Smad2-MH2(1KHX)的 173 个 C_α原子的均方根偏差(r.m.s.d.)仅为 0.52 Å(图 1(B)). 这种种属内及种属间的高度结构保守性是 Smad 蛋白在机体发育过程中发挥关键调节作用所必需的. Mad-MH2 和 Smad2-MH2 结构上的不同之处主要位于 β 三明治核心的两端, 包括 L3 loop, H1 螺旋和 C 末端 SSXS 序列, 这些部分都参与了同源三聚体的形成.

2.2 未磷酸化的 Mad-MH2 具有同源三聚化趋势

Smad 蛋白在体内外都能形成同源寡聚体, 主要由 MH2 结构域介导[15,29]. 在 Mad-MH2 晶体结构中, 一个不对称单位里有 4 个分子(图 2(A)), 其中 3 个分子(a~c)形成了和哺乳动物 Smad 蛋白一样的同源三聚体[16,17,26,27], 包埋了约 6500 Å^2 溶剂可及的分子表面; 第 4 个分子(d)和两个晶体学 3 次轴对称分子一起组成了同样的三聚体结构. 此外, 有研究[17]显示, 未磷酸化的 Smad1-MH2 的结构呈现相似的同源三聚体形式.

为了阐明未磷酸化的 Mad-MH2 晶体学 3 聚体的生物学意义, 本研究首先通过分子筛实验对其在溶液中的聚合状态进行了研究. 低浓度的未磷酸化 Mad-MH2(~15 μmol/L)在表观分子量约 30 kD 的位置被洗脱下来, 与其理论分子量 26 kD 基本一致(图 2(B)); 随着蛋白浓度的增高, Mad 开始聚集形成具有更高表观分子量的寡聚体, 最终形成三聚体(~250 μmol/L). 但是, 果蝇中的 Co-Smad Medea 并不随着蛋白浓度增高而聚合, 在分子筛上的洗脱位置没有明显变化. 鉴于 Mad-MH2 在晶体中的蛋白浓度高达约 19 mmol/L, Mad-MH2 在结晶过程中形成同源三聚体是可以预见的. 此外, 未磷酸化的哺乳动物 R-Smad 也有类似的同源三聚现象[14,15]. 上述结构和生化实验结果表明, 未磷酸化的 R-Smad 具有浓度依

赖的三聚化趋势.

2.3 R-Smad 三聚化主要由 C 末端介导, 由最后两个 Ser 残基的磷酸化稳固

在 Mad-MH2 晶体中, 一个分子的延展的 C 末端与相邻分子的 L3 loop 结合, 产生大量氢键和范德华相互作用, 从而形成一个稳定的 Mad-MH2 同源三聚体(图 2(A)). 其中, Arg416 与 Ser455 的羧基形成两个氢键, 并与 Val454 的羰基形成一个氢键; 同时, Lys408 通过氢键结合 Ser455 的羧基和 Ser452 的羰基(图 3(A)). 值得注意的是, Mad-MH2 的 C 末端 SSVS 序列形成了一些链内氢键, 进一步稳定了其与 L3 loop 结合的弓形构象. 譬如, Ser452 侧链上的羟基与

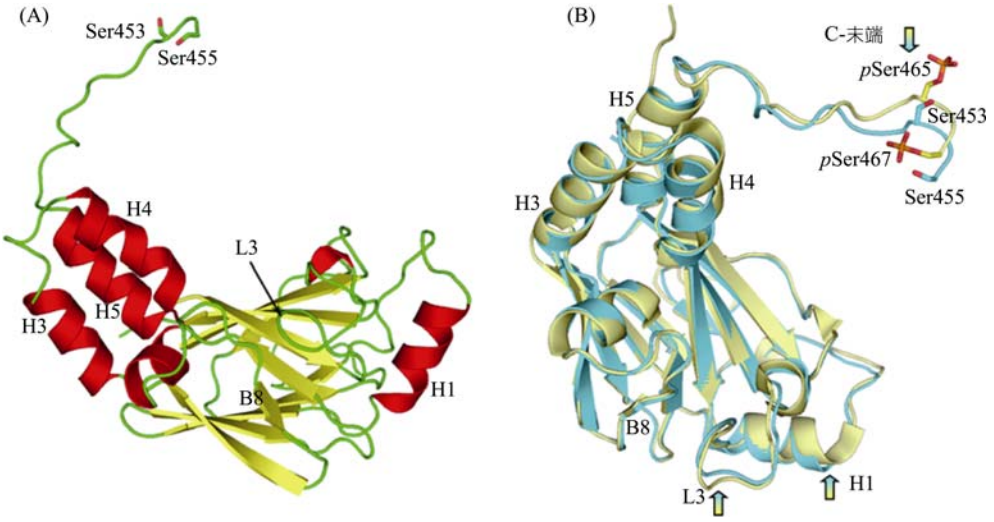

图 1 Mad-MH2 晶体结构

(A) 果蝇 Mad-MH2 三维结构示意图(A 分子), 主要的二级结构和 SSVS 序列最后两个 Ser 残基已在图中标出; (B) 未磷酸化的 Mad-MH2(蓝色)和磷酸化的 Smad2-MH2(黄色)的结构比对, 箭头所指为两者具有明显构象差异的区域

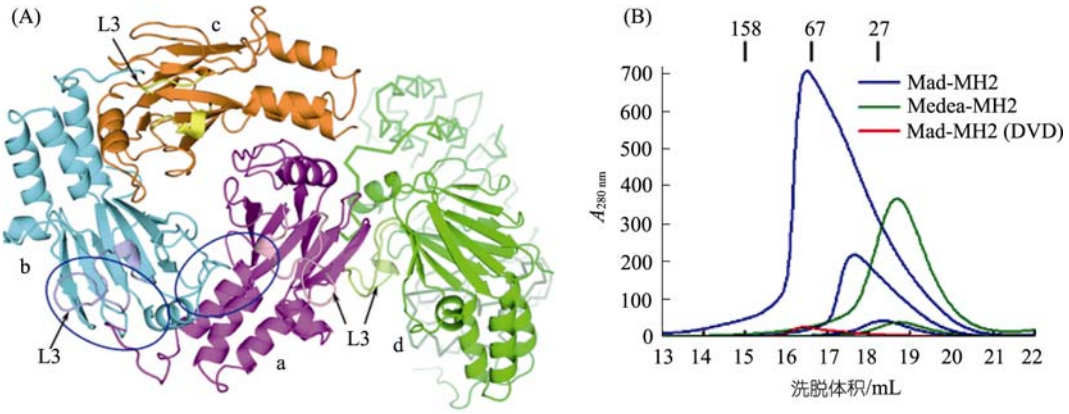

图 2 Mad-MH2 同源三聚体

(A) Mad-MH2 的三聚体结构. 一个不对称单位中的 4 个分子(a~d)分别以紫色、蓝色、橙色和绿色表示, 相应的 L3 loops 分别以淡紫色、淡蓝色、黄色和黄绿色表示; 圆圈所示部分为 a 分子和 b 分子之间的两个相互作用界面; d 分子的两个晶体学 3 次轴对称分子以浅绿色带状图表示; (B) 溶液中野生型 Mad-MH2 和拟磷酸化突变体(DVD)的聚合状态可通过分子筛层析测定不同浓度下蛋白的表观分子量来确定, 野生型 Mad-MH2(蓝色)样品浓度分别为 15, 70 和 250 μmol/L; Mad-MH2(DVD)突变体(红色)样品浓度为 15 μmol/L; Medea-MH2(绿色)样品浓度分别为 15 和 150 μmol/L

Ser455 和 Val454 主链上的氨基以及 Ser455 的侧链形成多个氢键, 这一结构分析验证了 Ser452 在 R-Smad 的功能执行中的重要性[11,30]. 此外, SSVS 序列之前的 I451 插入到相邻分子上由 H1 螺旋的 Thr316, H319 及 L3 loop 的 Val407 和 Lys408 组成的疏水口袋中, 形成的范德华相互作用进一步稳定了两个分子的结合(图 3(A)). 然而, 和磷酸化的 Smad2-MH2 同源三聚体结构[16]相比较, 未磷酸化的 Mad-MH2 三聚体缺失了大量由两个磷酸化 Ser 残基的磷酸根所介导的氢键. 因此, Mad-MH2 的 β 折叠 B8 与相邻分子的 C 末端之间没有相互作用, 两者之间的距离比在磷酸化的 Smad2-MH2 结构中增加了~2 Å. 在分子筛实验中, 拟磷酸化的 Mad-MH2(DVD)突变体在低浓度时就形成了三聚体, 具有明显的同源三聚化趋势(图 2(B)). 因此认为, 磷酸化引起的电荷变化提供了同源三聚化所需要的大部分能量, 有利于 R-Smad 的聚合.

在一个不对称单位中的同源三聚体里, 只有两个 Mad-MH2 分子的 C 末端与相邻分子结合, 第三个分子的 C 末端处于柔性无序状态, 不参与三聚体的形成(图 2(A)). 通过与 R-Smad/Smad4 异源三聚体结构的比较, 可以认为在 Co-Smad 存在时, 同源三聚体中带有柔性 SSVS 序列的分子可被 Co-Smad 取代, 从而形成具有生理功能的异源三聚体[15,18].

除了 C 末端 SSVS 序列和 L3 loop 之间的相互作用, 三聚体中还存在着另一个由一个分子的 loop-helix 区与相邻分子的三螺旋集束构成的蛋白-蛋白相互作用界面(图 2(A)). 在这个界面的中心, 一个分子的 H5 螺旋和相邻分子的 L1 loop 上的一些高度保守的氨基酸残基之间形成了一个氢键网络(图 3(B)). 此前, 本研究组曾解析了另一个 Mad-MH2 晶体结构, 单个分子的结构与本文的 Mad-MH2 结构高度相似, 只是 C 末端的 9 个氨基酸残基, 包括 SSVS 序列, 都处于柔性无序状态、没有稳定的空间构象[21]. 先前用于结晶的 Mad 蛋白的 C 末端保留了 His_6 亲和标签, 在结晶过程中并未形成三聚体, 在溶液中也以单体形式存在. 因此我们推测, C 末端的 His_6 标签虽然不会影响到 loop-helix 区和三螺旋集束之间的相互作用, 但很可能阻碍了 C 末端 SSVS 序列和 L3 loop 之间的相互作用. 由此可见, 相邻分子的 loop-helix 区和三螺旋集束间的相互作用不足以独立维持 R-Smad 蛋白的三聚化, C 末端与 L3 loop 之间的相互作用是形成三聚体所必需的, 而 C 末端 SSXS 序列的磷酸化将大

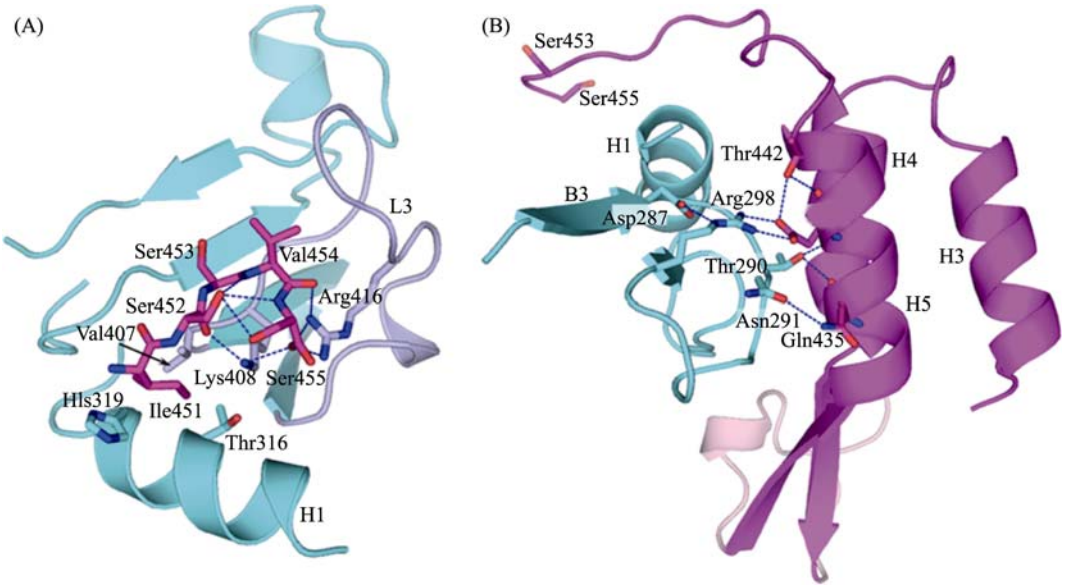

图 3　Mad-MH2 三聚体中相邻分子间的相互作用

(A) 一个分子的 C 末端 SSVS 序列(紫色)和相邻分子(蓝色)的 L3 loop(浅蓝色)之间的相互作用, 关键氨基酸侧链以棍状图表示; (B) 一个分子的 loop-helix 区域(蓝色)和相邻分子三螺旋集束(紫色)的相互作用界面上的氢键网络

大增强三聚体的稳定性.

综上所述, 本研究解析了 2.80 Å 的果蝇 Mad-MH2 结构, 发现未磷酸化的 Mad-MH2 在结构中形成了对称的同源三聚体, 而且在分子筛实验中表现出浓度依赖的寡聚趋势. 结构分析显示, Mad-MH2 同源三聚体的形成主要是由 C 末端 SSVS 序列所介导; 对拟磷酸化的 Mad-MH2(DVD)的分子筛实验表明, 最后两个 Ser 残基的磷酸化可以大大增强 Mad-MH2 的聚合能力. 有趣的是, 一个不对称单位中的同源三聚体里只有两个 Mad-MH2 分子的 C 末端 SSVS 序列具有稳定的空间构象; 通过与 R-Smad/Smad4 异源三聚体结构的比较表明, Mad-MH2 同源三聚体中带有柔性 SSVS 末端序列的分子较易被 Co-Smad 替代, 进而形成具有生理功能的 R-Smad/Co-Smad 异源三聚体.

致谢 感谢清华大学娄智勇博士和中国科学院生物物理研究所韩毅博士在数据收集和处理方面, 清华大学王佳伟博士在结构解析方面给予的帮助.

参考文献

1 Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 753—791[DOI]
2 Attisano L, Wrana J L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. Science, 2002, 296: 1646—1647[DOI]
3 Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell, 2003, 113: 685—700[DOI]
4 Raftery L A, Sutherland D J. TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads. Dev Biol, 1999, 210: 251—268[DOI]
5 Raftery L A, Twombly V, Wharton K, et al. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. Genetics, 1995, 139: 241—254
6 Sekelsky J J, Newfeld S J, Raftery L A, et al. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 1995, 139: 1347—1358
7 Derynck R, Zhang Y, Feng X H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. Cell, 1998, 95: 737—740[DOI]
8 Attisano L, Wrana J L. Smads as transcriptional co-modulators. Curr Opin Cell Biol, 2000, 12: 235—243[DOI]
9 Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. Genes Dev, 2005, 19: 2783—2810[DOI]
10 Shi Y. Structural insights on Smad function in TGFbeta signaling. Bioessays, 2001, 23: 223—232[DOI]
11 Abdollah S, Macías-Silva M, Tsukazaki T, et al. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. J Biol Chem, 1997, 272: 27678—27685[DOI]
12 Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engström U, et al. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. J Biol Chem, 1997, 272: 28107—28115[DOI]
13 Wu G, Chen Y G, Ozdamar B, et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. Science, 2000, 287: 92—97[DOI]
14 Qin B Y, Lam S S, Correia J J, et al. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. Genes Dev, 2002, 16: 1950—1963[DOI]
15 Chacko B M, Qin B, Correia J J, et al. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. Nat Struct Biol, 2001, 8: 248—253[DOI]
16 Wu J W, Hu M, Chai J, et al. Crystal structure of a phosphorylated Smad2: recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. Mol Cell, 2001, 8: 1277—1289[DOI]
17 Qin B Y, Chacko B M, Lam S S, et al. Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. Mol Cell, 2001, 8: 1303—1312[DOI]
18 Chacko B M, Qin B Y, Tiwari A, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. Mol Cell, 2004, 15: 813—823[DOI]
19 Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods Enzymol, 1997, 276: 307—326[DOI]

20 McCoy A J, Grosse-Kunstleve R W, Adams P D, et al. Phaser crystallographic software. J Appl Cryst, 2007, 40: 658—674[DOI]
21 Hao R, Chen L, Wu J W, et al. Structure of *Drosophila* Mad MH2 domain. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2008, 64: 986—990[DOI]
22 Adams P D, Grosse-Kunstleve R W, Hung L W, et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002, 58: 1948—1954[DOI]
23 Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004, 60: 2126—2132[DOI]
24 Morris A L, MacArthur M W, Hutchinson E G, et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates. Proteins, 1992, 12: 345—364[DOI]
25 Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. Oncogene, 2004, 23: 2071—2078[DOI]
26 Shi Y, Hata A, Lo R S, et al. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. Nature, 1997, 388: 87—93[DOI]
27 Qin B, Lam S S, Lin K. Crystal structure of a transcriptionally active Smad4 fragment. Structure, 1999, 7: 1493—1503[DOI]
28 Wu J W, Krawitz A R, Chai J, et al. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. Cell, 2002, 111: 357—367[DOI]
29 Wu J W, Fairman R, Penry J, et al. Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. J Biol Chem, 2001, 276: 20688—20694[DOI]
30 Kretzschmar M, Liu F, Hata A, et al. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. Genes Dev, 1997, 11: 984—995[DOI]