

Advance in the Research of Human Erythropoietin Receptor. Wang Shaoxiong, Dong Chen, Hua Zichun (*Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

Abstract Human erythropoietin receptor (hEPOR) is a transmembrane protein which located in the surface of the relatively mature erythroid progenitor cells. It can promote the viability, proliferation and differentiation of the cells by specifically binding to erythropoietin (EPO), in which process the hEPOR itself and some other proteins will be phospho-

rylated. There are some conserved domains in hEPOR which is adapted to its function. The amino acid sequence of the human EPOR is 82% identical to that of the mouse protein. The EPOR can be constitutively activated by a single R129C mutation or binding to a special protein. It is also closely related to many blood diseases such as erythroleukemia.

Key words human erythropoietin receptor (hEPOR), erythroid cell, cytokine receptor superfamily, transmembrane single transduction, erythroleukemia

甾体激素受体超家族的基因调控机制

毛俊浩 吕志良

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 甾体激素受体超家族是一类基因反式作用因子, 对 RNA 聚合酶 II 转录的某些蛋白质基因和 RNA 聚合酶 I 转录的核糖体 RNA 基因均有正或负的转录调节作用. 超家族对 RNA pol II 转录的基因调控的机理包括受体激活, 相关蛋白解离, 磷酸化, 同源/异源二聚化, 核转位, 与正/负激素应答元件及相应转录蛋白作用, 最终激活或抑制特异靶基因的转录. 甾体激素对 RNA pol I 转录的基因的调节作用以及超家族中的经典受体和孤儿受体非配合的激活机制是目前研究的热点.

关键词 甾体激素受体超家族, 结构与功能域, 正/负基因调控, 孤儿受体

甾体激素作用于细胞内的特异性受体 (绝大部分为核受体), 调控特定基因的表达, 对细胞发育, 分化和生理功能起着重要的调节作用. 多数受体已被鉴定, 克隆和测序. 近年来发现一些非甾体如甲状腺激素和视黄酸的受体的氨基酸序列与经典的甾体激素受体有着显著的同源性, 并且具有相似的高级结构, 因此认为它们是由共同的祖先基因演化而来, 构成了甾体激素受体超家族 (steroid hormone receptor superfamily, SHRS). 该超家族成员包括糖皮质激素受体 (GR)、孕激素受体 (PR)、盐皮质激素受体 (MR)、雄激素受体 (AR)、雌激素受

体 (ER)、维生素 D3 受体 (VDR)、甲状腺素受体 (TR α 、 β)、反式视黄酸受体 (RAR α 、 β 、 γ)、视黄酸 X 受体 (RXR α 、 β 、 γ)、蜕皮激素受体 (ECR)^[1]. 它们在作用机制上也具有相似性, 都是激素诱导的反式转录因子. 近年来利用该超家族中高度保守的 DNA 结合域为探针, 对不同种, 不同组织细胞的 cDNA 文库进行筛选, 发现许多与该超家族成员相关的蛋白质, 但没有找到与之结合的配体, 故称为孤儿受体 (orphan receptor). 目前已发现的孤儿受体有 EAR-1、EAR-2、COUP、ERR-1、ERR-

2、HNF4、TAILESS、SEVEN-UP、E75 A、B、ULTRASPILRACLE、KNRIPS、KNRIPS-RELATED、FTZ-F1、EMBRGONIC GONOD等^[1,2]。当前除了充分了解受体蛋白的结构与功能域,对超家族中的经典受体与孤儿受体的基因调控机制也有许多新的发现。本文综述该领域的最新进展。

1 甾体激素受体超家族的结构功能域

SHRS 有三个基本的结构域: N 端 (A/B) 是调节区, 中央 C 区是 DNA 结合域 (DNA binding domain), C 端 E 区是激素结合域 (hormone binding domain)^[1]。见图 1。

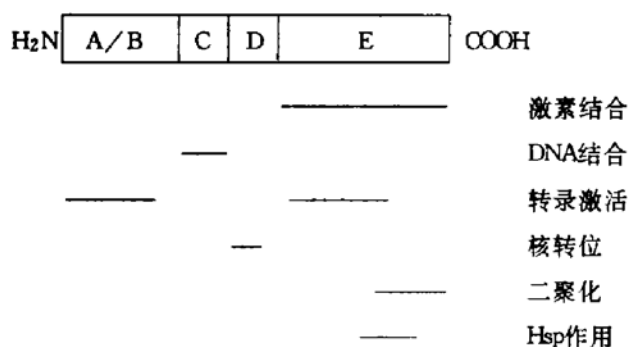


图 1 甾体激素受体超家族的结构与功能域

a. 肽链中央 C 区的 DNA 结合区由 66 或 68 个氨基酸构成, 具有高度的保守性。它的核心是二个锌指结构, 但不同于 TFIIIA 型锌指, 是由二对 Cys 与 Zn^{2+} 螯合, 这二个锌指结构 C I、C II 具有不同的功能: C I 含疏水性氨基酸, 以下游的三个氨基酸为主特异性地与 DNA 主沟碱基结合, 决定靶基因的激素反应元件序列的特异性。C II 富含碱性氨基酸, 与 DNA 螺旋的糖-磷酸基团非特异性结合, 起稳定受体与激素反应元件结合的作用。二个锌指结构在作用时相互协同。b. 紧邻 C 区的 D 区有一段 40 个氨基酸左右的序列为核转位信号。c. 羧基端的 E 区是激素结合区, 相对保守, 由 220—250 个氨基酸组成, 有激素结合, 二聚化, Hsp70/90 结合, 转录激活等多重功能。d. 氨基端 A/B 调节区的氨基酸组成与长度高度可变。它是受体

的二个转录激活区之一 (另一个位于 E 区), 且富含酸性氨基酸及 Gln、Pro。另外, 某些受体蛋白的亚型 (isoform) 的区别就在于其 N 端序列的差异。目前发现不同的亚型即不同的 N 端序列具有启动子专一性和细胞专一性, 也就是在选择激活不同的靶基因, 激素作用的多样性上具有重要的意义。

2 SHRS 对 RNA pol II 转录的基因调控

目前, 有关激素进行基因调控的机制, 绝大部分来自于 RNA pol II 转录的蛋白质基因的研究, 对于 RNA pol I 转录的 rRNA 基因调控的研究较少 (见后文)。

2.1 甾体激素受体的活化

2.1.1 激素结合与热休克蛋白 (Hsp) 的解离

激素结合是 C 端 E 区结构域的功能, E 区含有较多的疏水性氨基酸, 形成疏水性配基结合袋, 同时 E 区三级结构的正确折叠有赖于整个 E 区的参与。E 区除二个保守性较高的亚结构域之外, 其余相对可变的区域对于专一性结合具有决定性作用。这已经在人工定点突变和某些甾体激素抵抗症的自然突变中得到证实。如 AR734 位的 Arg 转变成 Glu, TR488 位的 Pro 转变成 His 等, 结果导致了激素结合活性的丧失。目前发现绝大部分甾体激素受体在体内未与激素结合之前, 处于 Hsp 蛋白结合状态。由于 Hsp 的结合, 使受体蛋白处于非活化状态, (不能形成二聚体, 不能与 DNA 结合)。一旦受体蛋白-Hsp 复合物与激素结合, 导致构象改变, Hsp 解离, 受体二聚化, 磷酸化, 就可与基因调控区域的特定 DNA 序列——激素应答元件 (hormone response elements, HREs) 特异性结合, 并通过与其它转录因子相互作用, 促进靶基因的激活。Hsp 蛋白结合位点是 E 区中央高度保守的 20 个左右的氨基酸。目前发现有数种 Hsp (Hsp90、Hsp70、Hsp50—59 等) 可与受体结合^[3]。如人 PR 结合有 Hsp90 与 Hsp70 二种热休克蛋白, 形成一个大的 8S 惰性复合物, 并且二者的解离也非同时, Hsp90 早于 Hsp70^[4]。但是, 与上述甾体激素受体 (包括

GR、MR 和性激素受体) 相反, RAR、TR 属于另一亚类, 它们不与 Hsp 蛋白结合, 这可能与 RAR 和 TR 的核紧密结合有关. 激素结合, Hsp 的解离据认为是受体活化的必要前提之一, 但目前有的研究却对此提出挑战^[1,5]. 如人工改造的缺乏激素结合域的 GR 能结构性地活化基因转录, 其调控机制可能与后文所述的孤儿受体的激活机制相类似.

2.1.2 受体磷酸化 激素诱导受体磷酸化也可能参与受体激活过程. 如发现受体-激素复合物的激活与 cAMP 信号通路存在正相关作用^[6]. 现已提出几种机制来解释磷酸化参与受体活化, 如磷酸化使受体变构暴露转录激活区; 调控受体核转位等等. 最近的研究结果表明, 受体磷酸化发生在激素受体复合物与 DNA 结合之后, 参与激活起始复合物^[6]. 可能有几种激酶, 如 cAMP 依赖的蛋白激酶 A, 酪氨酸蛋白激酶, Ca^{2+} /钙调素依赖的激酶参与了甾体激素受体的磷酸化过程, 但是并没有确证是哪一种激酶^[1,6,7]. 显然纯化并克隆这种激酶是了解磷酸化在受体介导的基因激活过程中的作用的关键.

2.1.3 同源/异源二聚化 甾体激素受体超家族与许多转录因子一样, 可以同源二聚体的形式与 DNA 的回文结构结合, 同源二聚体与 DNA 结合比单体具有更高的亲合性及稳定性^[2]. 二聚化的位点也位于 C 端的 E 区中, 若二聚化位点发生突变, 不能形成二聚体, 则转录活性大大降低, 说明二聚化也是受体激活靶基因的的必要前提之一. 最近的研究发现, 除了同源二聚体之外, 在不同类的受体之间还可形成异源二聚体并具有重要的生物学意义. 如 RAR α 和 TR β 能形成异源二聚体^[1]. RAR α -TR β 异源二聚体能与甲状腺素反应元件 (TRE) 结合, 可激活或抑制某些基因的转录. 目前多数认为上述异源二聚体是在 RAR α 和 TR β 二种受体亚型都表达的组织中一种基因转录的新的负调节机制. 另一个异源二聚体的例子是 RXR 的一种亚型可分别与 VDR、TR、RAR 形成异源二聚体^[1,8]. 这些异源二聚体与

单一受体的同源二聚体相比, 显示出不同的 DNA 亲和性. 这些由 RXR 与 RAR、VDR、TR 形成的异源二聚体系列可能汇成了具有不同转录活性的转录因子调节库. 如 RAR-RXR 异源二聚体可通过 RXR 反应元件抑制 RXR 诱导的基因激活, 却能通过 RAR 反应元件激活 RAR 诱导的基因转录. 迄今为止, 还未发现 RXR 能与 GR 形成异源二聚体, 而且能与 RXR 形成异源二聚体的 RAR、VDR、TR 似乎都与脊椎的发育有关, 故这些异源二聚体的形成与脊椎发育的复杂过程的高度多样性与特异性有关.

2.1.4 核转位 核转位也是受体与 DNA 作用的前提. 在 GR、AR、MR、PR 等的 DNA 结合结构域后紧跟一个 8 个氨基酸的保守序列, 具有核转位信号的作用^[2]. 在未结合激素之前, 受体蛋白与 Hsp 结合, 该信号被遮蔽, 激素结合之后, Hsp 解离, 该信号才发挥作用. 但是目前发现除了 GR 主要位于细胞质之外, 其余甾体激素受体主要位于核中, 以非特异性方式与染色体结合, 那么核转位信号确切的生理意义并不是很清楚.

2.2 SHRS 对靶基因的调控

2.2.1 激素应答元件 (hormone response elements, HREs) 受体蛋白激活后, 可与 DNA 结合直接调控靶基因的转录活性, 靶基因 DNA 上专一性的受体结合位点称为 HRE. 是由十多个碱基对组成的一个短序列, 其中有 3 个碱基对的回文序列, HRF 重复排列具有多个拷贝, 拷贝之间具有协同效应. 根据 HRE 的序列不同, 可分为四类:

GRE类: GAACAnnnTGTTT
(ARE, PRE, MRE, GER)

ERE类: AGGTCAnnnTGACCT
(ERE)

TER类: AGGTCATGACCT
(RAR, VDR, TRE)

COUP GTGTCAAAGGTCA

同一类 HRE 中, 由于序列的相似性, 故在体外 HRE 可能与多种受体蛋白存在不同程度的交

叉反应,而在体内,这种反应的特异性及其对靶基因特异性地激活会受到不同层次多种因素的影响,从而调控受体蛋白作用的多样性^[1,9].其中包括HRE的拷贝数,HRE邻近区域的上下文.另外,如TR能结合ERE,但不能激活转录,转录激活还需其它因子的参与.

2.2.2 与其它转录因子作用激活转录 甾体激素受体与HRE结合本身不能促进基因转录,它必须和其它转录因子作用才能促进转录.在RNA pol II型基因的启动子区域形成起始复合物(initiation complex)的各种蛋白质因子(包括RNA pol II和其它普遍性转录因子TFIID、TFIIB、TFIIF、TFIIE、TFIIH、TFIIJ等)是以一种确定的顺序形成复合物的.TFIID是唯一具有DNA序列特异结合的普遍性因子.TFIID首先与TATA盒结合,TFIIB再与TFIID-DNA复合物相互作用形成一个平台,然后与RNA pol II结合,TFIIF、TFIIE、TFIIH、TFIIJ等接着结合上去,形成一个起始复合物.目前发现许多转录因子和转录调节蛋白质能与TFIID作用,影响它与DNA的结合,从而调节转录活性^[10].而TFIIB是起始复合物形成的限速步骤,在转录激活中起一个中心作用.现在发现至少有三种甾体激素受体超家族成员(ER、PR、COUP)能与TFIIB直接作用,故受体与TFIIB的结合可能对于转录激活十分关键^[11].这可能是由于受体蛋白与HRE,TFIID与TATA盒的结合并不是十分稳固,TFIIB的结合可使这些因子与它们各自的顺式元件结合更为稳定.在这一稳定的复合物基础上RNA pol II,TFIIF、E、H、J等的进一步结合,导致了靶基因高水平的转录(图2).

受体与TFIIB作用位点是在受体蛋白C端E区的转录活性区,而与N端的转录活性区无关^[11].这与二个转录活性区功能有区别的报道是一致的.N端的转录活性区可能与其它的转录因子(如TFIID)作用,二者共同促进转录起始的过程.采用体外无细胞体系研究发现,TFIIB与受体蛋白的作用是直接的.但目前许多报道认为有接合蛋白(adapter,又称为coac-

tivator, mediator, bridging protein)的参与^[2,6,11].它们本身并无DNA结合位点,而介导普遍性转录因子与特定蛋白之间的相互作用.故在体内条件下,接合蛋白很可能参与普遍性转录因子与某些基因特异性的转录因子(如甾体激素受体等)之间越过几千个左右碱基对的距离而相互作用的过程.最近发现能与受体蛋白结合的转录因子除了TFIIB之外,还有NF1、SP1、CP1、OTF和NAF等^[1,8].均为启动子区域的TATA盒上游与各自顺式结合序列相结合的核转录因子.它们可能与甾体激素受体C端E区的转录激活区作用,如NAF可与VDR的E区中的一个亚结构域相作用,有的核因子也可能与N端的转录激活区作用.这些因子一方面可能与邻近的起始复合物作用,一方面可能与受体发生作用,从而在靶基因特异性的转录激活过程中发挥作用.

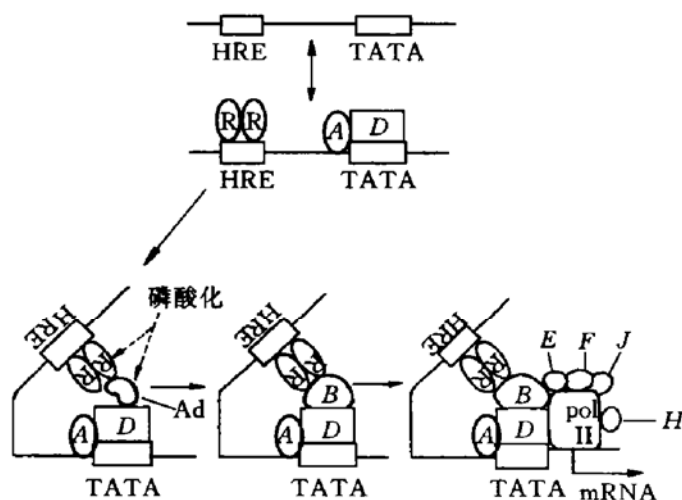


图2 甾体激素受体激活转录的可能机制

HRE: 激素反应元件, TATA: TATA盒; R: 受体激素复合物; A、B、D、E、F、H、J: TFIIB、TFIID、TFIIF、TFIIE、TFIIF、TFIIJ、TFIIH; Ad: 接合蛋白; pol II: RNA聚合酶 II.

2.2.3 激素的负调节 SHRS不仅能对基因转录发挥正调节作用,而且也能抑制某些基因的转录,即负调节作用.现已经在许多基因的调节区发现激素负反应元件(negative hormone response elements, nHRE)^[1,2].它们在序列上与经典的HRE有所不同,如催乳素

(prolactin) 基因的 nGRE 改变二个碱基就成为 GRE. 在不同的 nHRE 之间没有明显的同源性, 且 nHRE 与受体的亲合性比 HRE 要低. Diamond 等^[12]发现鼠的增殖素 (proliferin) 基因的 nGRE 与 AP-1 位点重叠, 该位点结合 fos-jun 二聚体或 jun 同源二聚体即能增强转录. 但在 GR 被激活的情况下事情发生了变化. 激活的 GR 和 jun 同源二聚体并存时, 转录激活, 激活的 GR 和 jun-fos 异源二聚体并存时则抑制转录, 因此净效应取决于一个细胞中 fos/jun 的比例. 另有一些 nGRE 似乎与 AP-2 位点重叠. AP-2 位点结合的是 cAMP 信号诱导蛋白 CREB. Oro 等^[13]发现糖皮质激素共有的 α 亚基基因的转录抑制是由于 GR 的 C 端激素结合域的空间位阻效应, 妨碍了 CREB 的结合, 但 GR 对胶原酶 I (collagenase I) 基因的负调节机制与上述两者均不相同. 胶原酶基因的启动子中不存在 GRE, 激活的 GR 也不直接与 DNA 结合, 而是通过蛋白质-蛋白质之间的相互作用实现基因的负调节, GR 的 DNA 结合区与 jun 单体的 DNA 结合区通过亮氨酸拉链直接相互作用形成无活性复合物, 从而抑制了 fos-jun 活性复合物的形成, 最终抑制了基因的转录. 又如在鼠的催乳素基因中, 去除 ERE 正调节元件后, ER 的 DNA 结合区附近的 63 个氨基酸能与转录蛋白 Pit 1 相互作用从而抑制转录. 现在关于糖皮质激素对 POMC 基因, 甲状腺素对 TSH β 基因负调节的研究也显示受体蛋白与其它转录因子的直接的非竞争性的蛋白质之间的结合可能是十分重要的^[2]. 因此目前趋向于认为负调节不仅仅是 DNA 结合蛋白通过各自反应元件之间的相互重叠简单地进行竞争, 而是一个包括和其它因子相互作用的更复杂的过程.

3 甾体激素对 rRNA 基因转录的调控

虽然早在 20 多年前就已发现了糖皮质激素能在体内或体外促进小鼠肝脏中核糖体 RNA 前体的合成, 但是与 RNA pol II 型基因的调控机制相比, 有关甾体激素对 RNA pol I

型基因的调控还远远缺乏了解.

在淋巴样组织中, 糖皮质激素对核糖体基因的转录显示了负调控作用. 在鼠淋巴瘤细胞中发现这种抑制作用与一个在 RNA pol I 型基因转录起始所必需的普遍性转录因子 TF I C 有关^[1]. 纯化的 TF I C 有三条肽链构成, 但不稳定, 并难以重新组成有生理活性的 TF I C 分子. 因此激素作用的结果是由于 TF I C 数量的减少或者是活性的降低仍未确定.

目前有关糖皮质激素对 rDNA 转录的调控是否也通过其受体介导仍不清楚. 在 rDNA 基因的调节区也存在一个保守序列, 与 GRE、PRE 等具有同源性. 这些序列能特异性结合 GR 或 PR, 但其亲合力比 HRE 低得多, 且这些序列结合 GR, PR 与 RNA pol I 基本的转录机制是否相关还存在疑问.

最近 Jacob 等又发现糖皮质激素对 rDNA 转录的负调节与一种特异性的 RNA pol I 转录因子有关, 命名为 E1BF^[1], 它能与基因调节区中与 GRE 同源的保守序列高亲合力结合. E1BF 是异二聚体, 一条多肽链相对分子量为 72 000—79 000, 另一条为 85 000—89 000. 二条多肽链对特异性结合都是必需的, 同时分子量 72 000—79 000 的肽链的结合力更强. E1BF 的二条肽链与 GR 都不相关. 它的负调控机制是通过受体与 E1BF 相互竞争和 DNA 结合, 还通过蛋白质-蛋白质之间的相互作用, 如受体与 E1BF 相互作用正在进一步研究之中.

4 孤儿受体的激活与调控机制

孤儿受体 (orphan receptor) 因其结构与一般甾体激素受体相似, 但仍未发现其配体, 有关它们在细胞中的功能日益引起人们广泛的兴趣.

O' malley 实验室^[7]较早开展了这方面的工作. 最初推测孤儿受体可能存在胞内配体. 这些胞内配体来自于体内激素合成代谢途径的中间产物. 但始终未找到其配体, 却在果蝇中又发现了另一类甾体激素超家族的成员. 它们缺少 C 端的激素结合区. 这意味着它们具有转录

激活的功能,但并不是配体依赖的。

1991年,发现孤儿受体之一的COUP能被神经递质多巴胺激活^[14]。可能通过这样一个途径:多巴胺与其膜受体结合,激活一系列磷酸化级联反应,最终将COUP磷酸化从而导致它的激活。在这个过程中多巴胺并不是作为一个配体,而是一个通过胞膜受体介导的间接的激活剂。这就引出了一个疑问:到底是否所有的甾体激素受体超家族成员都需要配体的存在?

最近,进一步研究发现某些经典的甾体激素受体(如PR、ER、VDR)也能在没有配体的情况下被膜受体激动剂(多巴胺)激活^[5,6]。而且这一过程也是通过磷酸化实现的,因为okadaic acid(一种强的磷酸化抑制剂)能抑制这种反应。同时,只有少数几种胞内甾体激素受体能被此途径激活,也只有少数几种膜受体激动剂能激活这种反应。这些结果又进一步显示了在真核细胞的信息传递途径之间的对话(crosstalking)和协同。

综上所述,SHRS作为一类既有信号转导功能又有转录因子活性的分子,它的激活以及对靶基因特异性激活或抑制的机制是复杂和多样的,受到多种因素的精确调控。孤儿受体及其激活机理的发现又使人们对真核细胞信号传递途径之间的“对话”(crosstalking)有了新的认识。目前对受体蛋白的激活,蛋白质/蛋白质之间的相互作用以及特异基因激活或抑制的分子机理,信号转导途径之间相互联系的研究,仍是个十分活跃的领域。

参 考 文 献

- 1 Reichel R R, Jacob S T. *FASEB*, 1993; **7**: 427
- 2 Fuller J F. *FASEB*, 1991; **5**: 3092
- 3 Scherrer L C, Picard D, Massa E *et al.* *Biochemistry*, 1993; **32**: 5381
- 4 Edwards D P, Estes P A, Fadok V A *et al.* *Biochemistry*, 1992; **31**: 2482
- 5 O'malley B W. *Trends Pharmacol Sci*, 1992; **13**: 318
- 6 Beck C A, Weigel N L, Moyer M L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90**: 4441
- 7 O'malley B W, Tsai M J. *Biology of reproduction*, 1992; **46**: 163
- 8 Bruggemeier U, Kalff M, Franke S *et al.* *Cell*, 1992; **64**: 565
- 9 Mader S, While J H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90**: 5603
- 10 Berkenstam A, Vivanco R M, Baretino D *et al.* *Cell*, 1992; **69**: 401
- 11 Ing N H, Beekman J M, Tsai S Y *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 17617
- 12 Diamond R F, Miner J N, Yoshinga S K *et al.* *Science*, 1990; **249**: 1266
- 13 Oro A E, Hollenberg S M, Rosenfeld M G *et al.* *Cell*, 1988; **55**: 1109
- 14 Power R F, Lydon J P, Conneely O M *et al.* *Science*, 1991; **252**: 1546

Mechanism of Gene Expression Regulated by Steroid Hormone Receptor Superfamily. Mao Junhao, Lu Zhiliang (*Department of Biological Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*).

Abstract Steroid hormone receptor superfamily is a kind of gene *trans*-acting factors and modulates both RNA pol I-directed rRNA transcription and RNA pol II-directed transcription. The molecular pathway of RNA pol II-directed transcription regulated by the superfamily includes the binding of ligand, dissociation of relative proteins, receptor phosphorylation, homo/hetero-dimerization, nuclear localization and interaction with positive or negative hormone response elements and related transcriptional proteins. As a result, the specific target gene is activated or repressed. Now more studies focus on the activating mechanism of some classic receptors and orphan receptors with or without ligand, as well as their regulations on specific gene transcription.

Key words steroid hormone receptor superfamily, structure and function domain, positive or negative gene regulation, orphan receptor