

甾体激素受体功能特异性的结构基础

张 馨, 叶玉珍, 丁达夫

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要:甾体激素受体家族包括雌激素受体、雄激素受体等五个亚家族,在机体组织细胞的生长分化、发育生殖、内环境稳定等几乎所有生理过程中都起着重要的作用。研究甾体激素受体亚家族的特异性可以加深对该家族功能的理解,并且具有潜在的临床应用价值。采用进化追踪方法对该家族的配体结合域(LBD)进行分析,探讨了决定亚家族功能特异性的结构基础。结果表明,甾体激素受体的各亚家族可能同相应的内源性配体存在着共进化关系;配体结合处的踪迹残基决定了受体-配体间的氢键作用和疏水相互作用模式并导致了亚家族的配体结合特异性。上述结论可用于甾体激素受体的配体结合特异性的改造以及新型组织选择性配体(如选择性雌激素受体调节剂, SERM)的设计。

关键词:甾体激素受体;配体结合域;加权进化追踪分析;踪迹残基

中图分类号:Q617 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-6737(2001)04-0685-10

甾体激素受体是核激素受体超家族的重要成员之一,包括雌激素受体(estrogen receptor, ER)、雄激素受体(androgen receptor, AR)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)和盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)等五个亚家族。它们的结构与功能受相应配体所调节,通过激活或抑制核内相应靶基因的表达,在发育、生殖、内环境稳定等几乎所有生理过程中都起着重要的作用^[1,2]。甾体激素受体均为多域蛋白,含六个域,包括差异很大的N端区域(A/B domain),高度保守的DNA结合域(DNA-binding domain, DBD, C domain),非保守的铰链区(D domain),中度保守的配体结合域(ligand-binding domain, LBD, E domain)和羧基末端(F domain)^[1,2]。其中配体结合域LBD除了结合配体外还同受体二聚化以及配体依赖的转录激活能力相关,同时LBD还是辅激活因子与辅抑制因子的结合部位,所以对于受体功能的发挥起着至关重要的作用。这里我们研究的重点是甾体激素受体的配体结合域。

甾体激素受体的LBD域有着相似的结构,通常含有12个 α 螺旋(H1-H12)及一个 β 转角,形成反平行的‘ α 螺旋三明治结构’。LBD域负责与甾体激素受体的内源性配体—甾体激素结合^[3-5]。受体-配体分子的结合诱导受体LBD的构象发生变化,促进LBD同辅激活因子结合,从而引起特异基因的转录表达,对配体信号做出应答^[6,7]。甾体激素均为胆固醇的代谢

收稿日期:2001-05-09

基金项目:国家自然科学基金重大项目课题(39990600-03);中国科学院知识创新工程项目课题

·KSCX2-2-07;KJ951-08)

作者简介:张馨,1974年生,在读博士研究生,电话:(021)64574430-5604, E-mail:qingz_sohu@sohu.com

通讯作者:丁达夫

产物,是刚性疏水小分子且结构极为相似。不同的甾体激素受体特异结合相应的甾体激素以发挥正常的功能,研究这种特异的受体-配体相互作用具有重要的理论和应用价值。Thornton 等人曾用经验性的进化分析方法分析雄激素受体的结构-功能关系^[8]。我们利用新近发展的加权进化踪迹分析方法^[9,10],对甾体激素受体各亚家族进行了更严格的进化分析。首先利用进化踪迹方法鉴别出甾体激素受体各亚家族的特异性残基位置,然后将这些残基位置映射到相应的蛋白结构上加以确认和深入的结构分析,由此确定与甾体激素受体亚家族功能特异性相关的特异性残基位置,阐明各亚家族特异功能的序列和结构基础。我们获得的特异性残基位置中有一部分与已有的致病突变位置一致,其余的可为进一步的定点突变实验、受体特异性的改造提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 序列

甾体激素受体家族成员的蛋白序列取自 SWISS-PROT 和 SP-TREMBL 数据库。以 ER 的 LBD 片断(即 esr1-human 的 311-551 区段)作为种子序列,利用 GCG 软件包中的 BLASTP 搜索同源蛋白,除去冗余片断和缺失片断,获得 56 条序列,用于进化踪迹分析。蛋白质的具体列表参见图 1。

1.1.2 结构

ER、PR 结合激动剂后的复合物结构取自 PDB 数据库,PDB 代码分别为 1A52、3ERD 和 1A28。

没有 AR 的晶体结构。我们首先利用 Swiss-Model^[11,12] 构建了 AR LBD 域(序列为 andr-human 的 668-918 部分)的三维结构;然后利用 PR 与孕酮的复合物结构,通过叠加 AR 和 PR 获得 AR 与孕酮的复合物结构;再利用 InsightII 工具对配体分子进行修改,获得 AR 与睾酮的复合物结构。

1.1.3 突变数据

AR 的突变数据取自 AR 突变数据库^[13,14]。

1.2 方法

1.2.1 进化树的构建

多重序列联配和进化树的构建采用软件 ClustalX-V1.81^[15]。

1.2.2 加权进化踪迹分析

根据多重联配结果计算亚家族中各位置的特异性分数。记蛋白质家族为 F , 其第 i 个亚家族为 S_i 。亚家族 S_i 在联配位置 p 的特异性分数为:

$$C_{S_i}(p) = \frac{V_F(p) + 1}{V_{S_i}(p) + 1} - 0.5$$

其中 $V_{S_i}(p)$ 为 S_i 亚家族中 p 残基位置的变异性分数, $V_F(p)$ 为整个家族内 p 位置的变异性分数。变异性的计算如下:

$$V_p = \sum_{i=1}^n \frac{v_{i,p}}{n}$$

其中 n 为家族(或亚家族)包含的序列数目。 $v_{i,p}$ 指以 i 序列作为参照,比较它与家族(或

亚家族)中其它序列之间的变异度:

$$V_{i,j} = \sum_{p=1}^n \frac{S_{M(i,p),M(j,p)} - S_{M(i,p),M(i,p)}}{S_{M(i,p),M(i,p)}} \times W_i$$

其中 $S_{M(i,p),M(j,p)}$ 表示 i 序列 p 位置的残基类型替换为 j 序列 p 位置残基类型时的置换分数,打分矩阵采用 *blosum60*。为了使 $v_{i,j}$ 的取值范围为 $[0-1]$,对打分矩阵进行变换,使得所有的分数都是正值。 W_i 为 i 序列的权值,如果一个序列与家族(或亚家族)中其它序列的相似性较高,则给该序列赋一个较小的权值。加权分析避免了序列采样不均对进化分析的影响,更大程度地体现序列多样性。权值的计算采用 Argos 等人的方法^[16]。 $C_{s_i}(p)$ 的值在 $0-1.5$ 之间。当 p 位置在亚家族 S_i 中相对保守而在整个家族中保守性较低时, $C_{s_i}(p)$ 的值较高,表

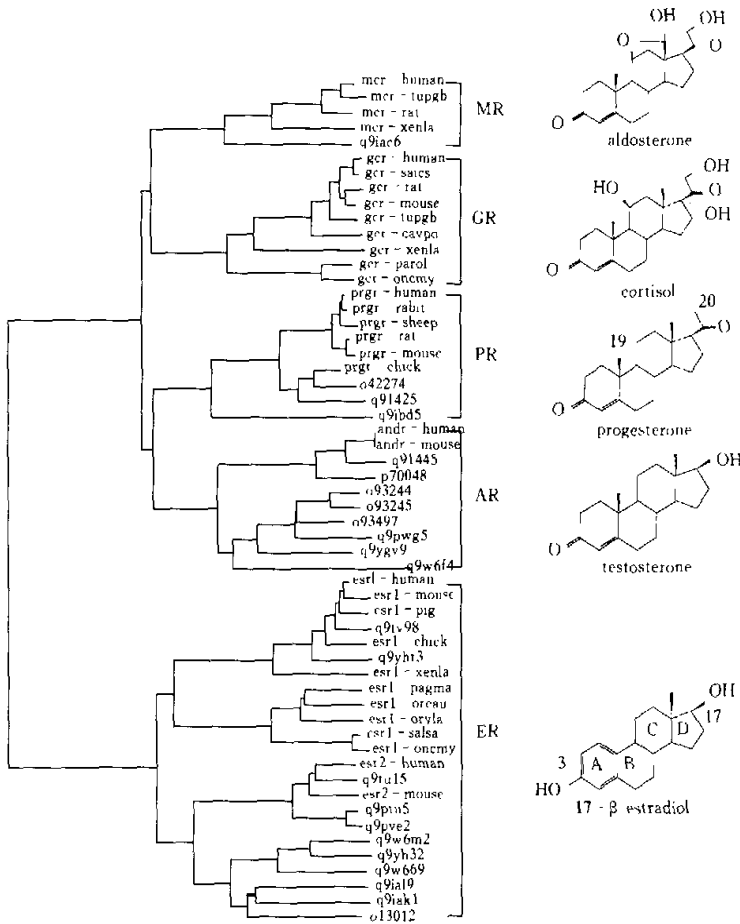


Fig.1 The Dendrogram of 56 selected steroid receptors' ligand-binding domains. The steroid receptor family is divided into five subfamilies: MR, GR, PR, AR and ER, whose endogenous ligands are shown beside

明该位置与亚家族 S_i 的功能特异性相关。而那些在亚家族 S_i 及整个家族中都很保守或都有很大差异的位置,特异性分数较低,这些位置对亚家族 S_i 的功能特异性贡献不大。

对于含 n 条序列的亚家族 S_i, 其特异性分数的参考阈值计算如下:从整个家族中随机抽取 n 条序列并计算相应各位点的特异性分数,重复上述操作 100 次,获得特异性分数的分布曲线,取显著性水平为 0.05 时的值为序列数 n 时的参考阈值。我们将亚家族 S_i 中残基特异性分数大于该亚家族参考阈值的残基称为踪迹残基。

1.2.3 甾体激素受体亚家族配体结合域的特异性分析

分别计算各亚家族 LBD 域中各个残基位置的特异性分数,并将特异性分数值大于相应阈值的残基位置映射到对应的蛋白质结构(晶体结构或模建的结构)上,在结构水平上进行确认和深入分析。一般认为处于蛋白质表面的残基与功能关系更直接。

缩小分析范围,聚焦到配体结合部位可以进行更直接的残基特异性分析。认为受体分子中侧链与配体分子任意一个原子的距离小于 6\AA 的残基参与配体结合,这里的计算基于 ER、PR 结合相应内源性配体的复合物结构。

2 结 果

2.1 进化树的构建

以 BLASTP 搜索所得的 56 条序列的 LBD 域构建进化树。整个进化树可被分成五枝,相应于甾体激素受体家族中的五个亚家族,分别由 ER 和 AR、PR、MR、GR 组成(图 1)。从图中可见,很明显序列的进化关系与相应的配体分子之间的相似性程度是相关的——五个亚家族对应于五种不同的配体分子。ER 同其它甾体激素受体序列的进化距离最远,ER 的内源性激动剂 $17-\beta$ 雌二醇同其它四个甾体激素的结构差异性也最大(主要体现在 A 环及 C₃ 上的取代基不同)。AR 与 PR 的进化距离较近,MR 与 GR 的进化距离较近。与之相应的是,睾酮(AR 的内源性配体分子)与孕酮(PR 的内源性配体分子)的结构相近,C₁₇ 位的取代基(分别为羟基和乙酰基)较小,C₁₁ 位无取代基团;而皮质醇(GR 的内源性配体分子)与醛固酮(MR 的内源性配体分子)的结构相近,C₁₇ 位的取代基团相对较大,C₁₁ 上的取代基为羟基。Escriva 等人曾指出:核激素受体超家族起源于孤儿受体,在进化过程中经过复制和变异,原来的孤儿受体形成不同的分枝,并逐渐获得了配体结合能力,形成了目前的各个亚家族。并且就整个核受体家族而言,可能不存在受体配体共进化的关系,但这并不排除共进化关系存在于它的某些亚家族中^[17-18]。我们的分析表明,甾体激素受体的各亚家族可能同相应的内源性配体存在着某种共进化关系。

2.2 甾体激素受体亚家族 LBD 域特异性的整体分析

甾体激素受体各亚家族成员的 LBD 部分有着相似的结构和作用方式,却能特异地识别结构相近的甾体激素并对激素信号作出应答。我们用加权进化踪迹方法寻找决定 ER 和 AR LBD 功能特异性的残基位置。

2.2.1 ER 的特异性分析

ER 与其它甾体激素受体家族的进化距离最远,我们首先对该亚家族进行序列特异性分析。一共找到 67 个 ER 的踪迹残基,其中 52 个(占 78%)为表面残基(在 ER LBD 晶体结构 3ERD 中侧链的溶剂可及面积大于最大可及面积的 10%)。有 22 个踪迹残基在已有的实验结果中已被验证与 ER 的功能相关,包括 D351、E353、L387、G400、F425、D426、G494、H513、

N519、K520、G521、M522、E523、H524、L525、M528、K529、K531、N532、Y537和D538(采纳 *esr1-human* 的序列编号)。这些残基位置的突变会导致 ER 与雌二醇亲和能力、ER 二聚化和转录激活能力等的改变^[19-21]。其余 45 个踪迹残基可作为进一步突变的靶位点。需要指出的是,还有一些已被实验验证与 ER 功能相关的突变残基位点在这里并不检测为踪迹残基,这些突变可能是因为影响了甾体激素受体家族共有功能的实施,或者改变了特异性残基位置的局部活性结构,从而影响到 ER 功能的发挥。

虽然这 67 个踪迹残基散布于整个 ER LBD 序列上,但是在 L6-7、H7、H11、L11-12、H12 上较为集中,这些部位均参与形成 ER 的配体结合口袋(ER 的配体结合口袋由 H3 的 N 端、H5、 β s1-s2、H6、H7、H11、L11-12 和 H12 所构成,ER 的结构参见图 2)。Ekena 等人曾指出 ER LBD 中接近 C 末端的 515-535(相应于 H11、L11-12 区段)对于配体的结合非常重要,许多位点突变后会引雌二醇亲和能力的改变,同时 H11 与受体的二聚化相关^[21,22]。加权进化踪迹分析的结果也表明这两个区段富含踪迹残基,与 ER 的功能特异性相关。

2.2.2 AR 的特异性分析

用同样的方法对 AR 亚家族的 LBD 进行分析,有 66 处为踪迹残基位置。其中 45 处(占 68%)为表面残基(在模建的 AR LBD 结构中侧链的溶剂可及面积大于 10%)。AR 的突变数据库^[14]收集了导致雄激素失敏综合症(androgin insensitivity syndrome, AIS)或前列腺癌的突变资料,在 LBD 域中,这些与疾病相关的突变部位密集在 H3、L3-4、H4、H5、 β S1-S2、H6 和 L11-12 上。我们检测到的 26 个踪迹残基,包括 A687、G688、D695、S703、G708、V715、R726、G743、V746、G750、Y763、R774、M780、C784、R788、S791、G820、Q824、R831、Y834、R840、T877、L880、P892、V903、P904(采纳 *andr-human* 的序列编号)与 AR 突变数据库提供的疾病相关突变位置一致。

与 ER 相比,AR LBD 中的踪迹残基位置更为分散。在 AR LBD 中,H6、H11 及 H9 上的踪迹残基相对较多。其中 H6、H11 参与 AR 配体结合口袋的形成。H9 为双亲 α 螺旋,可能参与同其它结构域的相互作用。

2.3 配体结合部位的特异性分析及比较

着眼于配体结合部位对踪迹残基进行分析,并将这些踪迹残基映射到相应的蛋白结构上,

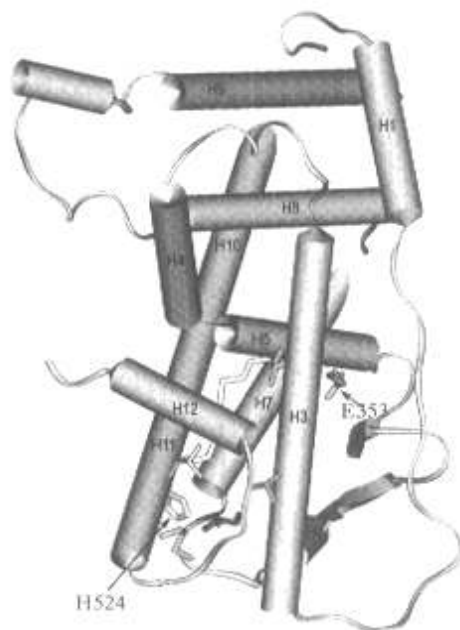


Fig.2 Trace residues in ER ligand-binding site are mapped on the structure of ER LBD (PDB Code: 3ERD). The α -helices (H1-H12) of ER LBD are represented as rods labeled with numbers. The side-chains of trace residues are highlighted in sticks

从而获得甾体激素受体亚家族配体结合特异性的序列和结构基础。在 ER 配体结合部位,共检测到 T347、A350、E353、L387、M388、I424、G521、H524、L525、M528 和 L536 等 11 个特异性残基位置(图 2)。其中有 9 个残基位置也是 AR 的踪迹残基,对应位置是: T347(N705)、A350(G708)、E353(Q711)、M388(V746)、I424(Q783)、G521(L873)、H524(F876)、L525(T877)、L536(F891)。将这些残基分别映射到 ER 与雌二醇的复合物结构、PR 与孕酮的复合物结构以及模建的 AR 与睾酮的复合物结构上进行结构分析。分析结果表明这些踪迹残基决定了甾体激素受体与相应的内源性配体分子之间不同的氢键作用模式和疏水相互作用模式,从而决定了不同甾体激素受体特异的配体结合活性。

2.3.1 决定甾体激素受体-配体氢键相互作用的踪迹残基

ER 的 E353 和 H524 同配体雌二醇之间形成独特的氢键作用模式(图 3),与其它甾体激素受体及相应配体分子间的作用不同。

E353 作为氢键受体,与雌二醇 A 环中 C₃ 位的酚羟基形成氢键;而其它甾体激素受体相应位置均是 Gln,扮演氢键供体的角色,与相应甾体激素 C₃ 位的酮基形成氢键。可见 E353 是决定不同甾体激素受体结合活性的一个重要因素,与已有的实验结论相符。Ekena 等人将 E353 置换成 Q,突变后的 ER 对雌二醇的亲合力降低了 9 倍,而对睾酮的亲合力提高了 10-140 倍^[23]。

五种内源性甾体激素中,雌二醇和睾酮 C₁₇ 位上的取代基为羟基,而孕酮、皮质醇和醛固酮的 C₁₇ 位由更大的取代基取代了羟基,并且在 C₂₀ 位含有一个酮基(见图 1)。与之相匹配的是,ER H524 的 ND1 与雌二醇 D 环中 C₁₇ 位的羟基形成氢键,其它四种甾体激素受体中对应位置为疏水性氨基酸(F、Y 或 I),侧链基团不会参与形成氢键(AR 与 C₁₇ 位羟基的作用模式后文还会讨论到);PR 的 T894(GR、MR 中分别为 Thr 和 Ser)作为氢键供体与相应配体的 C₂₀ 位酮基形成氢键,雌二醇和睾酮的 C₂₀ 位没有酮基结构,对应于 PR 的 T894 残基位置在 ER 与 AR 中均为疏水残基,前者为 Met(或 Ile),后者为 Leu。

2.3.2 决定甾体激素受体-配体疏水相互作用的踪迹残基

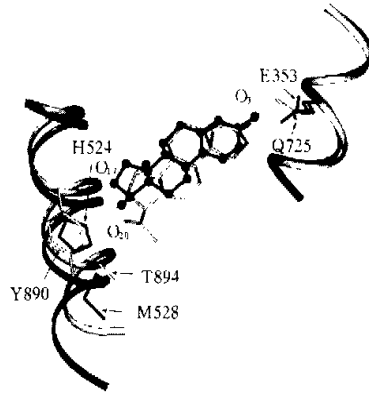


Fig.3 Comparison of hydrogen-bond interactions between estradiol-ER LBD complex and progesterone-PR LBD complex. Estradiol-ER LBD and progesterone-PR LBD complex are superimposed, where ER LBD is partially shown in dark ribbon and PR LBD is partially shown in light ribbon. The side-chains of trace residues in ER LBD(E353, H524, M528) and their corresponding sites in PR LBD(Q725, Y890, T894) are highlighted in sticks. Estradiol is shown in dark ball-and-sticks while progesterone is shown in light sticks. ER residues E353 and H524 form hydrogen bonds with estradiol O₁ and O₂ respectively; PR residues Q725 and T894 form hydrogen bonds with progesterone O₁ and O₂₀ respectively.

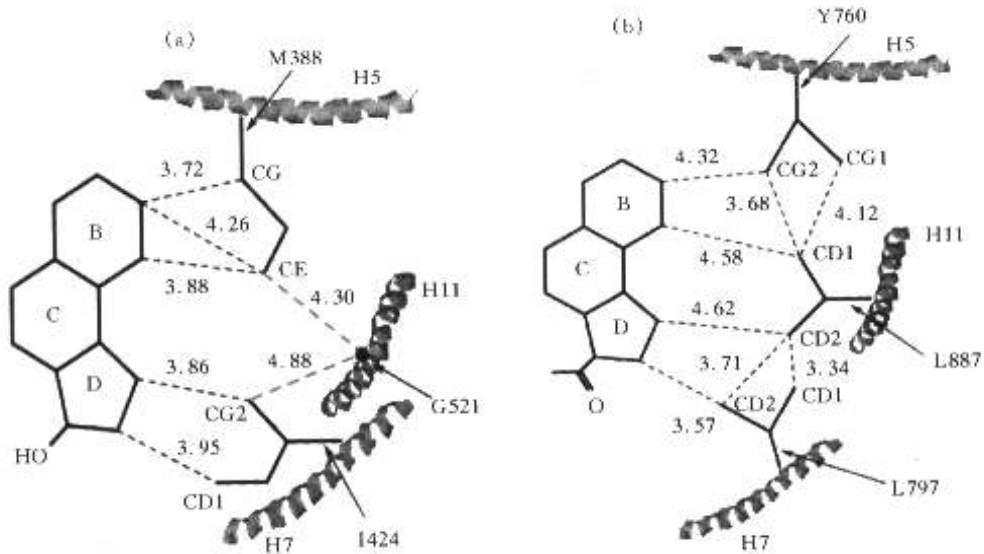


Fig. 4 Comparison of van der Waals interactions between estradiol-ER LBD(a) and progesterone-PR LBD(b) focusing on three adjacent trace residues. Distances between interacting atom pairs are shown in dashed lines labeled with numbers

甾体激素受体的配体结合部位周围分布有许多疏水残基，与相应配体分子的杂环骨架之间形成很好的疏水相互作用，但不同的甾体激素受体-甾体激素之间的疏水相互作用模式存在一定的差异。ER中参与和杂环骨架相互作用的踪迹残基有M388、I424、G521（图4a），相应位置在PR中为V760、L797、L887（图4b），并分别计算在ER和PR中相关原子对之间的距离。结构上表现为与ER相比，PR LBD的H5和H11两个螺旋更靠近一些，PR中V760 Ca与L887 Ca间的距离为 8.92\AA ，而ER中相应残基位置-M388 Ca与G521 Ca间的距离为 9.38\AA 。已有突变实验表明踪迹残基G521对ER和其配体雌二醇的结合很关键，G521A导致ER的雌二醇结合能力降低，而G521R无法结合雌二醇^[21, 24, 25]。这两个突变均改变了受体-配体相互作用模式，后者更甚，突变为亲水大侧链残基。

2.3.3 其它踪迹残基的分析

踪迹残基ER L387主要与配体分子C₁₉位的空间位阻相关。和其它甾体激素相比，只有雌二醇不含C₁₉位甲基。如果将其它受体中与ER L387位置相对应的残基-Met或Ser（侧链上无分枝基团）换成Leu，则会与相应甾体激素的C₁₉位甲基产生空间位阻。

踪迹残基ER L525与C₁₇位的空间位阻相关。在配体结构中，随着C₁₇位的取代基团逐渐增大——由雌二醇、孕酮中的羟基变为孕酮中的乙酰基，再到皮质醇、醛固酮中更大的取代基团；对应于受体中邻近位置的氨基酸侧链逐渐变小——由ER中的Leu、AR中的Thr再到PR、GR、MR中的Cys，以避免空间位阻的产生。另外，根据模建的AR LBD结构，AR中该位置的T877可能与孕酮C₁₇位羟基形成氢键。有实验表明前列腺细胞株LNCaP中，AR的T877突变成Ala后降低了对雄激素结合的专一性，可以和雌二醇、孕酮及抗雄激素结合并产生转录激活效应^[26]，它表明我们的推测是合理的。

踪迹残基 ER L536 位于 L11-12 上,其它受体中相应部位侧链更大的 Phe 或 Tyr 可能使 H12 的激活态构象更易形成。

3 讨 论

研究亚家族特异的残基位置有助于加深对蛋白质功能的理解,是进行亚家族水平上功能预测的基础,并且具有潜在的应用价值。实验上可以通过定点突变、丙氨酸扫描(Ala-scanning)等方法进行关键残基的研究,但花费较大、周期较长,而且难于辨认功能特异残基。蛋白质序列数据库促进了检测关键残基的计算方法的发展。在进化过程中,蛋白家族成员经历了广泛的随机突变和长期的自然选择,引起功能的演化和亚家族的形成,在家族成员序列上记录了进化中的变异事件,因此通过分析残基序列的保守性可以进行关键残基的研究。在整个蛋白质家族中均保守的残基与蛋白质结构的维系以及家族的共性有关,那些仅在亚家族内部保守而在亚家族之间不保守的特异性残基往往与亚家族的功能特异性相关,如配体结合特异性等。进化踪迹分析充分利用已有的序列信息,快速有效地确认同亚家族功能特异性相关的残基,结合结构分析进而确定这些特异性残基在结构上的位置与分布,从而建立起蛋白质序列-结构-功能间的相互关系。

对 ER 和其它甾体激素受体 LBD 域的进化踪迹分析表明,运用这种方法找到的踪迹残基能很好地与结构、功能相联系,揭示了形成亚家族功能特异性的氨基酸位点。为今后改造甾体激素受体的配体结合特异性^[27]以及新型组织选择性配体的设计^[28](如选择性雌激素受体调节剂, SERM)提供了结构基础。另外,计算不同蛋白亚家族踪迹残基的交集部分,将这些部位的残基进行互换可以使这两个亚家族的功能朝着对方转变,对蛋白质工程设计提供了重要的线索。

参考文献:

- [1] Pascal FE, Bruno PK, Dino M. Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones[J]. *FEBS Letter*. 2000,476:62-67.
- [2] Ross VW, Robert JF, Thomas SS. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains[J]. *Annu Rev Biochem*. 1999,68:559-581.
- [3] Shiau AK, Barstad D, Loria PM. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen[J]. *Cell*. 1998,95(7):927-937.
- [4] Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor[J]. *Nature*. 1998,393(6683):392-396.
- [5] Lanenbaum DM, Wang Y. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains[J]. *Proc Natl Acad Sci*. 1998,95(11):5998-6003.
- [6] Willam B, Pierre G, Hinrich G. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications[J]. *Trends Pharmacol Sci*. 2000,21(10):381-388.
- [7] Dino M, Hinrich G. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function[J]. *Curr Opin Cell Biol*. 1998,10(3):384-391.
- [8] Thornton JW, Kelley DB. Evolution of the androgen receptor: structure-function implications[J]. *Bioessays*. 1998,20(10):860-869.
- [9] Lichtarge O, Bourne H.R, Cohen FE. An evolutionary trace method defines binding surfaces common

- to protein families[J]. *J Mol Biol.* 1996,257(2):342-358.
- [10] Landgraf R, Fischer D, Eisenberg D. Analysis of heregulin symmetry by weighted evolutionary tracing[J]. *Protein Eng.* 1999,12(11):943-951.
- [11] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling[J]. *Electrophoresis.* 1997,18:2714-2723.
- [12] Peitsch MC. ProMod and Swiss-Model. Internet-based tools for automated comparative protein modelling[J]. *Biochem Soc Trans.* 1996,24:274-279.
- [13] Florence H, Gerrit V, Fred EC. Collecting and harvesting biological data: the GPCRDB and NucleaRDB information systems[J]. *Nucl Acids Res.* 2001,29:346-349.
- [14] <http://www2.mcgill.ca/androgendb/>[Z].
- [15] Jeannmougin F, Thompson JD, Gouy M. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. *Trends Biochem Sci.* 1998,23:403-405.
- [16] Sibbald PR, Argos P. Weighting aligned protein or nucleic acid sequences to correct for unequal representation[J]. *J Mol Biol.* 1990,216(4):813-818.
- [17] Escriva H, Safi R, Hanni C. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci.* 1997,94(13):6803-6808.
- [18] Escriva H, Delaunay F, Laudet V. Ligand binding and nuclear receptor evolution[J]. *Bioessays.* 2000,22(8):717-727.
- [19] Miller N, Whelan J. Random mutagenesis of human estrogen receptor ligand binding domain identifies mutations that decrease sensitivity to estradiol and increase sensitivity to a diphenol indene-ol compound: basis for a regulatable expression system[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998,64(3-4):129-135.
- [20] Wrenn CK, Katzenellenbogen BS. Structure-function analysis of the hormone binding domain of the human estrogen receptor by region-specific mutagenesis and phenotypic screening in yeast[J]. *J Biol Chem.* 1993,268(32):24089-24098.
- [21] Ekena K, Weis KE. Identification of amino acids in the hormone binding domain of the human estrogen receptor important in estrogen binding[J]. *J Biol Chem.* 1996,271(33):20053-20059.
- [22] Fawell SE, Lees JA. A proposed consensus steroid-binding sequence—a reply[J]. *Mol Endocrinol.* 1989,3(6):1002-1005.
- [23] Ekena K, Katzenellenbogen JA. Determinants of ligand specificity of estrogen receptor- α : estrogen versus androgen discrimination[J]. *J Biol Chem.* 1998,273(2):693-699.
- [24] Schodin DJ, Zhuang Y. Analysis of mechanisms that determine dominant negative estrogen receptor effectiveness[J]. *J Biol Chem.* 1995,270(52):31163-31171.
- [25] Damehan PS, White R. Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen[J]. *Mol Endocrinol.* 1993,7(2):232-240.
- [26] Veldscholte J, Ris-Stalpers C. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens[J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990,173(2):534-540.
- [27] Doyle DF, Mangelsdorf DJ. Modifying ligand specificity of gene regulatory proteins[J]. *Curr Opin Chem Biol.* 2000,4(1):60-63.
- [28] Dutertre M, Smith CL. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action[J]. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000,295(2):431-437.

STRUCTURAL BASIS OF FUNCTIONAL SPECIFICITY OF STEROID RECEPTORS

ZHANG Qing, YE Yu-zhen, DING Da-fu

*(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)*

Abstract: The steroid receptors include the estrogen receptor, androgen receptor, progesterone receptor, glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor. They are involved in almost all physiological activities, including reproduction, homeostasis, cell proliferation, differentiation and death. Elucidating the specificity of steroid receptors' subfamily will deepen understanding of their functions and has potential pharmaceutical applications. The evolutionary trace method was used to analyze structural basis of functional specificity of steroid receptors. Results indicated that steroid receptors and its endogenous ligands may experience some coevolutionary process; trace residues in ligand-binding sites display different hydrogen-bond interactions and van der Waals contacts between receptors and its ligands, which decide subfamilies' ligand binding specificity. These informations can be used to modify ligand specificity of steroid receptors and design tissue-selective ligands (e.g. selective estrogen receptor modulator).

Key Words: Steroid receptor; Ligand-binding domain;
Weighted evolutionary tracing; Specific residue