

LIM 同源盒转录因子在发育中的作用机制

刘耀波* 汪家政 范 明

(军事医学科学院基础医学研究所神经生物学研究室, 北京 100850)

摘要 LIM 同源盒转录因子 (LIM-homeodomain transcription factor, LIM-HD) 通过调控体内一些基因的表达决定脊椎和非脊椎动物发育中组织和细胞的特异性分化. LIM-HD 蛋白凭借 LIM 结构域, 通过分子内和分子间的相互作用来调节自身的功能状态. 这一调节的机制可能是: LIM 结构域通过促进蛋白质之间的作用正性调控 LIM-HD 蛋白的功能, 使其能够与组织特异性启动子的调控区结合; 也可能通过阻止 HD 区与相关 DNA 的结合来负性调控 LIM-HD 的功能. LIM 结构域与其他蛋白的结合可解除这种负性调控, 允许 DNA 分子的结合, 提示 LIM-HD 的一种新的作用机制.

关键词 LIM 同源盒转录因子, LIM 结构域, 发育, 调控

学科分类号 Q78

LIM-HD 蛋白属于同源盒蛋白质家族, 由于其氨基端包含两个并列的富含半胱氨酸和组氨酸的 LIM 结构域 (LIM domain) 而命名. LIM 结构域名称来自 LIM-HD 家族中三个基因名称首字母的缩写, 即: *lin-11* (线虫), *isl-1* (鼠) 和 *mec-3* (线虫).

在一个多细胞机体中, 每个细胞最初都拥有相同的遗传特征, 但在发育过程中每种类型的细胞都获得了与其功能相适应的特异性, 这种特异性的获得都必经一个过程: 激活它所需的特异性基因, 抑制其他非特异性基因. 而转录调节因子, 如 LIM 基因家族, 则在这一过程中发挥重要作用^[1].

在发育调控中, 控制特定基因转录的关键是如何调控转录的调控子, 而 LIM 结构域正是通过分子内或分子间的作用来调节 LIM-HD 蛋白的功能活性. 在缺少 LIM 结合蛋白的情况下, LIM 结构域与 HD 区相结合以阻止 LIM-HD 蛋白和相关的 DNA 结合, 而一旦 LIM 结合蛋白与之结合, 这种蛋白质二聚体便会共同结合在 DNA 上形成一个转录复合体. 多水平 LIM-HD 蛋白的调控作用正是通过这种相互作用的逐级放大而实现的^[2].

1 LIM-HD 蛋白的功能作用

1.1 LIM-HD 蛋白的调控环节

在发育过程中, 细胞特异性是逐步获得的. 细胞首先获得相对于整个机体而言的位置特异性信息, 允许不同类型细胞在特定位置聚集, 然后会表现出不同的组织特异性, 包括: 增殖能力, 形态学

特征, 组织特异性蛋白质的表达等. LIM-HD 转录因子的调控环节包括早期特征的形成及后期组织特异性基因的表达^[3].

1.2 LIM-HD 蛋白调控组织特征的形成

有许多 LIM-HD 蛋白在机体和器官特征形成中发挥作用, 如在小鼠和果蝇中 *lim-1* 的 RNA 通常通过表达一定形式的 Lim-1 蛋白质诱导神经中胚层和背侧中胚层一些特征基因表达, 并促使外胚层组织形成一个二级轴. 在 *lim-1* 基因缺失的小鼠神经中胚层和背侧中胚层的特征性基因不能表达, 也不进一步构成二级轴^[4].

1.3 LIM-HD 蛋白控制细胞的特异性分化

对于在不同组织中发挥作用的 LIM 家族基因, 我们将其列于表 1. 其中 *mec-3* 基因是线虫触觉受体神经元分化所必需的, *mec-3* 基因功能丧失的突变体便不会获得触觉受体神经元的特征^[5]. 而触觉受体神经元特征性基因如 *mec-4*, *mec-7* 的表达在 *mec-3* 基因突变体中也会明显减少或缺失^[6]. 另外 Lim3 蛋白是维持发育中垂体腺 Rpx 表达所必需的. 并使前叶和中叶的细胞系形成、分化和增殖. 在胚胎期间, 如果缺少 *lim-3* 的表达, 垂体腺的前体——Rathke's 囊会正常凹陷, 最初 Rpx 的表达也是正常的, 但随后 Rpx 的表达便会消失, 前叶和中叶的细胞系不能形成. 另外 Lim-3 蛋白可直接调控垂体腺前叶功能性基因的表达. 在缺少

* 通讯联系人.

Tel: 010-66931316, E-mail: Liuyb@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-06-02, 接受日期: 2000-07-07

lim-3 基因的动物中, 与垂体腺功能特异相关的激素 α 促性腺激素 (α gonadotropin stimulating hormone, α GSH) 和 β 促甲状腺激素 (β thyroid stimulating hormone, β TSH) 的表达便会消失^[7].

Table 1 Identified roles of LIM-HD proteins during development

表 1 LIM-HD 蛋白在发育中的角色

蛋白质名称	种属来源	组织分化中的作用	特异性细胞分化的作用
Lim-1 (Lhx1)	脊椎动物	机体中轴的形成	
Lim-3 (Lhx3)	脊椎动物		垂体细胞, 运动神经元
Gstr-4 (Lhx4)	脊椎动物		肺, 运动神经元
Lmx-1	脊椎动物	肢体的形成	
LH-2 (Lhx2)	脊椎动物		造血细胞
Isl-1	脊椎动物		运动神经元
Isl-2	脊椎动物		运动神经元
Lim-5 (Lhx5)	脊椎动物	间脑的形成	
Ap	果蝇	翅膀的形成	肌肉细胞, CNS 神经元
Awh	果蝇		视觉前体细胞
Isl	果蝇		运动神经元和中间神经元
Lin-11	线虫		外阴的前体细胞
Mec-3	线虫		触觉受体神经元

1.4 LIM-HD 蛋白在多个发育阶段中具有功能

这一方面最为典型的例证是果蝇 *ap* 基因. 在突变体中, 如 *ap* 缺失, 则表达 *ap* 的前体细胞来源的肌肉将会消失, 而 *ap* 基因的异位表达会导致肌肉的异位生长. 中枢神经系统一些特定神经元的形成和分化也依赖 *ap* 基因的表达: 在 *ap* 缺失的突变体中, 这些神经元可正常形成并伸出突起, 但这些突起并不能沿正确的途径延伸, 也不能形成相应的神经束. 另外, *ap* 基因功能丧失也会导致雌性失去生育能力. 以上基因多项性的缺陷说明 *ap* 基因在发育不同阶段的多点效应^[8].

1.5 LIM-HD 蛋白在神经系统有特异性的作用

大部分 LIM-HD 蛋白表达于中枢神经系统的发育阶段并在神经发育和分化中发挥作用. 所有的运动神经元最初都表达 *isl-1* 和 *isl-2* 基因, 随后 *lim-1* 和 *lim-3* 一过性的表达, 提示 *isl-1* 和 *isl-2* 基因可能参与运动神经元的特征形成. 而一些独特的神经元亚类联合表达这 4 种 LIM-HD 基因转录因子. 因此推测: *isl-1* 和 *isl-2* 基因, *lim-1* 和 *lim-3* 基因的联合性表达可能决定神经元的类型, 使其能够识别并分布到正确的靶细胞. 定点突变了 *isl-1* 的小鼠缺少运动神经元, 说明 *isl-1* 是运动神经元所必需的. 类似研究不仅证明 *lim-3* 和 *lim-4* 决定运动神经元的分化和轴突寻路, 而且提示这些

基因参与脑发育中的特异性分区^[9].

2 LIM-HD 蛋白的作用机制

在发育中, LIM-HD 蛋白对细胞调控是通过在时间和空间上控制特异性基因的表达, 来决定其是否能够正常的发育. 作用方式可从以下 5 个方面来分析.

2.1 LIM-HD 蛋白的一级结构特点

每个 LIM 结构域中保守的半胱氨酸、组氨酸、精氨酸残基可与两个锌离子结合. 而 LIM-Only 蛋白的 LIM 结构域则与 GATA-1 型的锌指结构非常相似. LIM 结构域主要介导与其他蛋白质之间的相互作用, 这些蛋白质包括: 细胞骨架成分、胰岛素的受体、POU 同源盒蛋白、bHLH 蛋白、还有其他的 LIM 蛋白.

除了 LIM 和 homeobox 结构域外, 其他的氨基酸成分如富含脯氨酸和谷氨酸的结构位点和酸性区也同样参与转录功能^[10].

2.2 LIM 结构域抑制 LIM-HD 蛋白的功能

分子内的 LIM 结构域可与 HD 区结合以阻止它与 DNA 的结合: 在体外, 小鼠 *Isl-1* 的 HD 区能够与同源盒结构域的“TAAT”结合位点相结合, 但全长 *Isl-1* 蛋白却不能从一个随机序列库中筛选到“TAAT”序列, 也不能在凝胶转移实验中与

“TAAT”序列相结合或与相关序列结合并激活报告基因的转录。但这些结果都可以通过去除或破坏 *Isl-1* 的 LIM 结构域而逆转^[11]。

在蟾蜍的体外实验中,注射了 *Lim-1* 全长 RNA 或未注射的胚胎移植物均能形成具有外胚层特点的组织,但均不表达神经组织、中胚层和外胚层前部发育所需的基因,这些组织都可被组织导体所正常诱导。如果在胚胎移植物中注射了缺失 LIM 结构域或功能的 *Lim-1* 全长 RNA 则会诱导表达神经组织和外胚层前部所需的特异性基因^[12]。以上研究说明, LIM 结构域的作用是抑制 *Lim-1* 活动。

2.3 蛋白质之间的相互作用激活 LIM-HD 蛋白

LIM-HD 蛋白通过 LIM 结构域和 HD 区结构域相互作用来阻止它与 DNA 结合。在许多模型中, LIM 结构域的结合抑制作用可因与其他蛋白的结合而被破坏。LIM-HD 蛋白及其结合蛋白见表 2。

Table 2 Interacting partners of LIM-HD proteins

表 2 LIM-HD 蛋白与其他作用蛋白

LIM-HD 蛋白	结合蛋白	所属蛋白质家族
<i>Mec-3</i>	<i>Unc-86</i>	POU-HD
<i>Lim-3</i>	<i>Pit-1</i>	POU-HD
<i>Lmx-1</i>	<i>Pax-1</i>	BHLH
<i>Lim-1</i> (<i>Lbo1</i> , 2)*	<i>Ldb-1</i> = <i>NLI</i> = <i>CLIM-2</i>	CLIM
<i>Lim-3</i>	<i>CLIM-1</i>	CLIM
<i>Ap</i>	<i>Chip</i>	CLIM

* *Lbo1* 和 *Lbo2* 属于 LIM-only 蛋白质家族,它们是失去了 HD 区的 LIM-HD 蛋白。

Ldb1 是 LIM 结合蛋白质 (LIM-binding proteins), 或称做 LIM 协同因子 (cofactor of LIM, CLIM) 家族中的一员。CLIM-1 和 *Ldb-1* (CLIM-2) 作为一种结合蛋白可在体外与许多 LIM-HD 蛋白相结合,并使 LIM-HD 蛋白从阻抑状态下解脱出来。体外实验中,添加 CLIM-1 可以使 *Lim-3* 的活性增加 3 倍,这一水平相当与 LIM 结构域缺失时所观察到的水平^[13]。

LIM-HD 蛋白与其他转录因子的结合也可加强自身的活性。这种作用多由 LIM 结构域所介导。研究显示, *Lim-3* 和 *Mec-3* 可以共同作用于 POU-HD 转录因子而激活转录;在缺少 DNA 的情况下, *Mec-3* 和 *Unc-86* 可以免疫共沉淀,提示它们的相

互作用独立于与 DNA 的结合^[14];同样只有在 LIM 结构域完整时 *Lim-3* 在体外才可与 *Pit-1* 蛋白质结合;而且 β -TSH 启动子被 *Lim-3* 和 *Pit-1* 协同激活过程必须有 LIM 结构域,而这个作用可因 LIM 结构域的改变或缺失而消失^[15]。

LIM-HD 蛋白与其他转录因子之间复杂的结合作用支持这样一个模型:多种因子联合性调节 LIM-HD 蛋白和重要发育基因的活性。但所有这些结合都是 LIM 结构域依赖性的。

2.4 LIM-HD 蛋白是怎样控制转录的

大量的研究证明, LIM-HD 蛋白对发育中转录的调控至少涉及到两方面的活动,调节 HD 区与 DNA 的结合及形成一个转录复合体。在缺少结合蛋白的情况下, LIM 结构域通常在空间构象上阻抑 HD 区与 DNA 的结合。HD 区与结合蛋白的结合使其摆脱 LIM 结构域与它的结合而得以与 DNA 相结合, LIM-HD 特异性的转录便会被启动。另外一个水平的调控方式是通过 LIM 结构域与其他转录调控蛋白的相互作用而实现的。这些分子相互作用组成一个复合体并且对其中一个或多个成分进行进一步的加工,从而诱导组织特异性基因的表达。

LIM 结构域对 LIM-HD 活性的分子内阻抑就象一个阀门机制用来防止发育中重要基因的表达被错误激活,同时也加强和促进 LIM-HD 的功能。

LIM-HD 蛋白及其相互作用蛋白质的联合表达提供了一个细胞间调控发育的机制。当正确的蛋白质结合物出现在同一细胞中时,特异的基因便被激活。因此对于一个给定的 LIM-HD 蛋白,其结构域的分段表达以及各种不同的 LIM 结合蛋白的存在,提供了通过单一的 LIM-HD 蛋白调控不同细胞内和不同发育时间上多个发育事件的途径。

LIM-HD 蛋白与其结合蛋白之间复杂的相互作用目前并不完全知晓。Wadman 和他的同事们^[16]提出这样一个转录复合体假设, *Lbo2* 的转录复合体中 LIM 结构域和 *Ldb-1* 是作为一个桥梁联结 GATA-1 和 bHLH 蛋白;他们可能在转录复合体中居于中心位置;在缺少 HD 区的条件下, LIM-HD 蛋白的 LIM 结构域通常不能激活转录。

3 展望将来的研究

调控 LIM-HD 蛋白活性的关键一方面在于明确和分析与它们相互作用的蛋白质,另一方面在于对 LIM-HD 蛋白的 LIM 结构域和 HD 结构域的结构学分析^[17]。随着新的相互作用蛋白质的出现和

LIM-HD 蛋白完整结构认识的不断提高, 对它们分子间相互作用机制的理解将会进一步加深.

参 考 文 献

- McGinnis W, Levine M S, Hafen E, *et al.* A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature*, 1984, **308** (5958): 428~ 433
- Jennifer C, Joseph S H. DeLIMiting development. *BioEssays*, 1998, **20** (1): 58~ 69
- Appel B. LIM itless combinations? *Neuron*, 1999, **22** (1): 3~ 5
- Shawlot W, Behringer R R. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature*, 1995, **374** (6521): 425~ 430
- Way J C, Chalfie M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*, 1988, **54** (1): 5~ 16
- Mitani S, Du H, Hall D H, *et al.* Combinatorial control of touch receptor neuron expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 1993, **119** (3): 773~ 783
- Sheng H Z, Moriyama K, Yamashita T, *et al.* Multistep control of pituitary organogenesis. *Science*, 1997, **278** (5344): 1004 ~ 1007
- Lundgren S E, Callahan C A, Thor S, *et al.* Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*. *Development*, 1995, **121** (6): 1769~ 1773
- Thor S, Andersson S G, Tomlinson A, *et al.* A LIM-homeodomain combinatorial code for motor neuron pathway selection. *Nature*, 1999, **397** (6714): 76~ 80
- Gehring W J, Affolter M, Burglin T. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 487~ 526
- Sanchez-Garcia I, Osada H, Forster A, *et al.* The cysteine-rich LIM-domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1. *EMBO J*, 1993, **12** (11): 4243~ 4250
- Taira M, Otani H, Saint-Jeannet J P, *et al.* Role of the LIM class homeodomain protein *Xlim-1* in neural and muscle induction by the Spemann organizer in *Xenopus*. *Nature*, 1994, **372** (6513): 677 ~ 679
- Agulnick A D, Taira M, Breen J J, *et al.* Interaction of the LIM-domain-binding factor *Ldb1* with LIM homeodomain proteins. *Nature*, 1996, **384** (6606): 270~ 272
- Lichtsteiner S, Tjian R. Synergistic activation of transcription by UNC-86 and MEC-3 in *Caenorhabditis elegans* embryo extracts. *EMBO J*, 1995, **14** (16): 3937~ 3945
- Bach I, Rhodes S J, Pearse R V, *et al.* P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (7): 2720~ 2724
- Wadman I A, Osada H, Grutz G G, *et al.* The LIM-only protein *Lmo2* is a bridging molecule assembling an erythroid DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1, and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J*, 1997, **16** (11): 3145~ 3157
- Perez-Alvarado G C, Kosa J L, Louis H A, *et al.* Structure of the cysteine-rich intestinal protein, CRIP. *J Mol Biol*, 1996, **257** (1): 153~ 174

The Mechanism of LIM-homeodomain Transcription Factor in Development

LIU Yao-Bo*, WANG Jia-Zheng, FAN Ming

(Institute of Basic Medical Sciences, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract LIM-homeodomain transcription factor (LIM-HD) regulated expression of genes that pattern the body and generate cell specificity during development in invertebrates and vertebrates. LIM-HD proteins are themselves regulated by both intramolecular and intermolecular interactions mediated by the LIM domains. LIM domains positively regulate LIM-HD activity by promoting protein-protein interactions that allow cooperative binding to regulatory regions of tissue-specific promoters. They also negatively regulate LIM-HD activity, possibly by preventing HD association with DNA. Interaction of LIM domains with other proteins relieves this interference, permitting DNA binding and providing a mechanism for refining LIM-HD activity.

Key words LIM-homeodomain transcription factor, LIM domain, development, regulate

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931316, E-mail: Liuyb@nic.bmi.ac.cn

Received: June 2, 2000 Accepted: July 7, 2000