

hhLIM与 actin 相互作用 依赖其 C 端 LIM 结构域*

郑 斌 温进坤** 韩 梅 史建红

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 hhLIM 是 LIM 蛋白家族成员之一, 该蛋白质含有两个 LIM 结构域, 在基因表达调节、细胞骨架结构及细胞肥大过程中发挥重要作用. 构建 hhLIM 不同 LIM 结构域的突变体, 探讨其两个 LIM 结构域在与 actin 相互结合中的作用及其可能机制. GST-pull down 和 hhLIM 及其突变体与 actin 细胞定位关系的免疫荧光分析结果表明, C 端的 LIM 结构域 2 是 hhLIM 与 actin 结合所必需的, 该结构域中的两个 Cys 置换为 Ser 后可使 hhLIM 结合 actin 的功能完全丧失, N 端的 LIM 结构域 1 突变使 hhLIM 结合 actin 的能力下降. F-actin 交联实验结果显示, hhLIM 通过 LIM 结构域 2 与 actin 直接结合并起到交联 F-actin 的作用. 结果表明, LIM 结构域 2 在 hhLIM 与 actin 相互作用及调节 actin 细胞骨架结构中起决定性作用.

关键词 hhLIM, LIM 结构域, 细胞定位, 细胞骨架结构

学科分类号 Q78

LIM 蛋白是一类富含半胱氨酸且分子结构中有一个或多个锌指结构的蛋白质家族(Lin-Isl-Mec), 该家族中的蛋白质分子都含有特征性的氨基酸保守序列(CX₂CX_{17~19}HX₂CX₂CX_{16~20}CX₂C/H/D), 即 LIM 结构域 (LIM-domain)^[1]. hhLIM (human heart lim) 是从人胎心 cDNA 文库中筛选克隆的一个与心脏生长发育有关的新基因, 其表达产物含有典型的 LIM 结构域, 属于 LIM 蛋白家族成员^[2]. hhLIM 作为一种穿梭蛋白, 具有胞浆和胞核双重定位^[3]. 我们近期研究发现, 胞核中的 hhLIM 可以启动细胞肥大相关基因, 如 BNP 和 α -actin 表达, 在胞浆, hhLIM 与 actin 相互作用参与细胞骨架的组构^[4]. hhLIM 含有 2 个 LIM 结构域, 每个结构域均可与某种特定的蛋白质相互作用, 但是哪个结构域在胞核中与转录因子相互作用、哪个结构域在胞浆中与 actin 相互作用目前尚不清楚. 本研究分别构建不同 LIM 结构域的突变体, 通过 GST-pull down 分析检查 hhLIM 不同 LIM 结构域在与 actin 相互结合中的作用并探讨其可能机制.

1 材料和方法

1.1 重组质粒的构建

利用重组 PCR 定点突变技术, 构建 hhLIM

LIM 结构域 1 (10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser) 和 LIM 结构域 2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser) 突变体表达质粒, 即分别以 hhLIM 表达载体 pcDNA₃-hhLIM 和 GST-hhLIM 融合蛋白表达载体 pGEX-3X-hhLIM 为模板, 按照定点突变试剂盒说明书设计引物 P1 (5' G GAGGCGCAAAATGTGGAGCCTGTGAAAAGAC CGTC TAC) 和 P2 (5' GA GAGTCCGAGAAGTG-CCCTCGATGTGGCAAGTCAGTC TATG 3'), PCR 扩增参数为: 95℃变性 30 s 后, 95℃ 30 s, 55℃ 1 min, 68℃ 6 min, 扩增 18 个循环. PCR 产物中加入 1 μ l Dpn I, 37℃反应 1 h 后, 转化大肠杆菌, 筛选获得 LIM 结构域 1 突变体融合蛋白表达质粒 pGEX-3X-hhLIM1(10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser)、LIM 结构域 2 突变体融合蛋白表达质粒 pGEX-3X-hhLIM2(120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser)、LIM 结构域 1 突变体表达质粒 pcDNA3-hhLIM1(10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser)、LIM 结构域 2 突变体表达质粒 pcDNA3-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser). 重组质粒的序列测定由上海生

*新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0261), 教育部科学技术研究重点项目(206016), 国家自然科学基金(30300132)和河北省自然科学基金(2004000644)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0311-86265563, E-mail: wjk@hebm.edu.cn

收稿日期: 2006-09-18, 接受日期: 2006-09-30

工生物技术公司完成。

1.2 细胞培养、转染及蛋白质提取

小鼠成肌细胞 C2C12 细胞系为本室保存。在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长的 C2C12 细胞为未分化型细胞(MB); C2C12 细胞生长至 70%~80%密度时, 换成含 2%马血清的 DMEM 培养液诱导细胞分化, 在这种培养液中培养 48 h 至细胞铺满培养皿后, C2C12 细胞被诱导分化为成熟的分化型细胞(MT)。C2C12 细胞(MB)生长至 60%密度时, 用脂质体介导法, 分别转染 hhLIM 及其不同 LIM 结构域突变体表达质粒。用含 2%马血清的培养液诱导细胞分化, 按文献[5]的方法提取细胞蛋白质。

1.3 细胞免疫荧光化学分析

用含 2%马血清的培养液诱导转染不同重组质粒的 C2C12 细胞分化, 4%多聚甲醛固定, 1% Triton X-100 处理, 封闭后, 依次加入抗标签(myc)抗体(1:400)和 FITC 标记的二抗(1:200), PBS 充分漂洗后, 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.4 GST pull down 分析

取结合有 GST-hhLIM、GST-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser)、GST-hhLIM2(120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser)蛋白的 GST-Sepharose 4B 10 μl (约含融合蛋白 10 μg) 与 10 μg 分化型 C2C12 细胞(MT)蛋白提取液混匀, 4℃孵育 8 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。再用结合缓冲液 (40 mmol/L Hepes pH 7.8, 40 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 10% 甘油, 1.5 mmol/L DTT) 漂洗沉淀 4 次, 每次 15 min。沉淀加入 SDS 上样缓冲液, 经 SDS-PAGE 分离、转膜和脱脂奶粉封闭后, 依次加入抗 α-actin 抗体和羊抗兔 IgG 进行结合反应, ECL 发光试剂检测结果^[6]。

1.5 肌动蛋白体外交联 (F-actin cross-linking) 实验

按文献[7, 8]报道的方法进行。取 150 μg G-actin (Sigma 公司) 溶解于 50 μl 聚合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L ATP, 0.5 mmol/L DTT, 90 mmol/L KCl) 中, 室温反应 30 min, 使其聚合为 F-actin。分别取经 GST 亲和层析纯化的 GST-hhLIM、GST-hhLIM1 和 GST-hhLIM2 蛋白与 F-actin 聚合物溶解于交联缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L ATP, 0.5 mmol/L DTT, 27 mmol/L KCl, 100 mmol/L NaCl) 中至终浓度为 1 g/L 和 3 g/L, 室温静置 30 min,

8 000 r/min 离心 30 min, 收集上清 (S, 未与 hhLIM 交联的 F-actin) 和沉淀 (P, 与 hhLIM 交联的 F-actin) 一部分进行 SDS-PAGE, 另一部分沉淀进行电镜观察。

1.6 细胞收缩实验

按文献[9]方法进行。转染 hhLIM 及其不同结构域突变体表达质粒的 C2C12 细胞, 用 2%马血清培养 48 h 诱导细胞分化, 更换为平衡液 (138 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1.06 mmol/L MgCl₂, 12.4 mmol/L HEPES, 5.6 mmol/L glucose, pH 7.3), 然后滴加乙酰胆碱至终浓度为 100 nmol/L, 于高倍显微镜下观察 1 min 内单个 C2C12 细胞长度缩短的幅度。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建及其在大肠杆菌中的表达

DNA 测序结果显示, 所构建的 hhLIM、GST-hhLIM 及其不同 LIM 结构域突变体表达质粒 pcDNA3-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser)、pcDNA3-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser)、pGEX-3X-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser)、pGEX-3X-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser) 的核苷酸序列及突变位点正确。将各种融合蛋白表达质粒分别转染大肠杆菌, 经 IPTG 诱导表达及 GST 亲和柱层析纯化后, 洗脱液在 SDS-PAGE 上呈现单一的 46 ku 蛋白质条带, 分子质量与预期值一致 (图 1)。

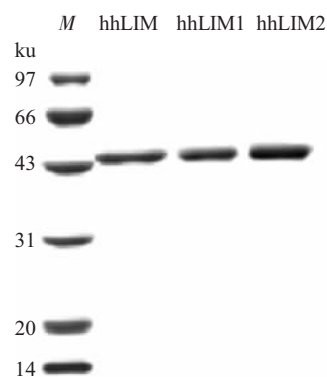


Fig. 1 SDS-PAGE for purified GST-hhLIM fusion protein
M: Protein marker; hhLIM: GST-hhLIM fusion protein; hhLIM1: GST-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser) fusion protein; hhLIM2: GST-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser) fusion protein.

2.2 hhLIM 与 actin 相互作用的区域

为了确定 hhLIM 是否与 actin 发生物理学上的相互作用及其相互作用的结构域, 以结合有

GST-hhLIM、GST-hhLIM1、GST-hhLIM2 的 GST Sepharose 4B 为亲和介质分别对分化型 C2C12 细

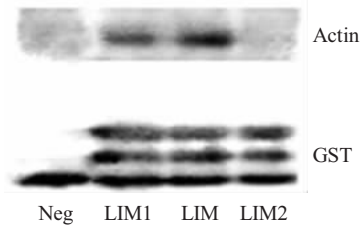


Fig. 2 GST-pull down assay shows the interaction between hhLIM and actin

Extracts from C2C12 cells were precleared with GST Sepharose beads and then incubated with GST-hhLIM Sepharose beads, or LIM domain-mutated (GST-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser,13^{Cys}→Ser), GST-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser)) Sepharose beads or GST Sepharose beads. Pellets were washed, and interacting proteins were separated by SDS-PAGE and identified by Western blotting with anti-GST or anti-actin antibody. Neg: Negative control; LIM1: GST-hhLIM1(10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser) fusion protein; LIM: GST-hhLIM fusion protein; LIM2: GST-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser) fusion protein.

胞裂解液进行淘选, 与亲和介质结合的蛋白质用抗 α-actin 抗体进行蛋白质印迹分析. 图 2 结果显示: 在结合有 hhLIM 的亲和介质结合物中可以检测到 actin 的存在, 结合有 hhLIM1 的亲和介质结合物中虽可检测到 actin 的存在, 但其结合量明显减少, 而结合有 hhLIM 2 的亲和介质结合物中则检测不到 actin 的存在, 说明 LIM 结构域 2 是 hhLIM 与 actin 相互作用的主要结构域.

2.3 hhLIM 及其突变体的亚细胞定位

图 3 结果显示, 在转染 pcDNA₃-hhLIM 表达质粒的细胞中, hhLIM 呈束状沿肌丝分布, 细胞体积明显变大, 转染 LIM 结构域 1 突变体表达质粒 pcDNA₃-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser, 13^{Cys}→Ser) 的细胞, hhLIM 仍沿肌丝分布, 但细胞体积明显小于转染 hhLIM 的细胞, 转染 LIM 结构域 2 突变体表达质粒 pcDNA₃-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser, 123^{Cys}→Ser) 的细胞, hhLIM 不再沿肌丝分布, 而是弥散分布于胞浆中.

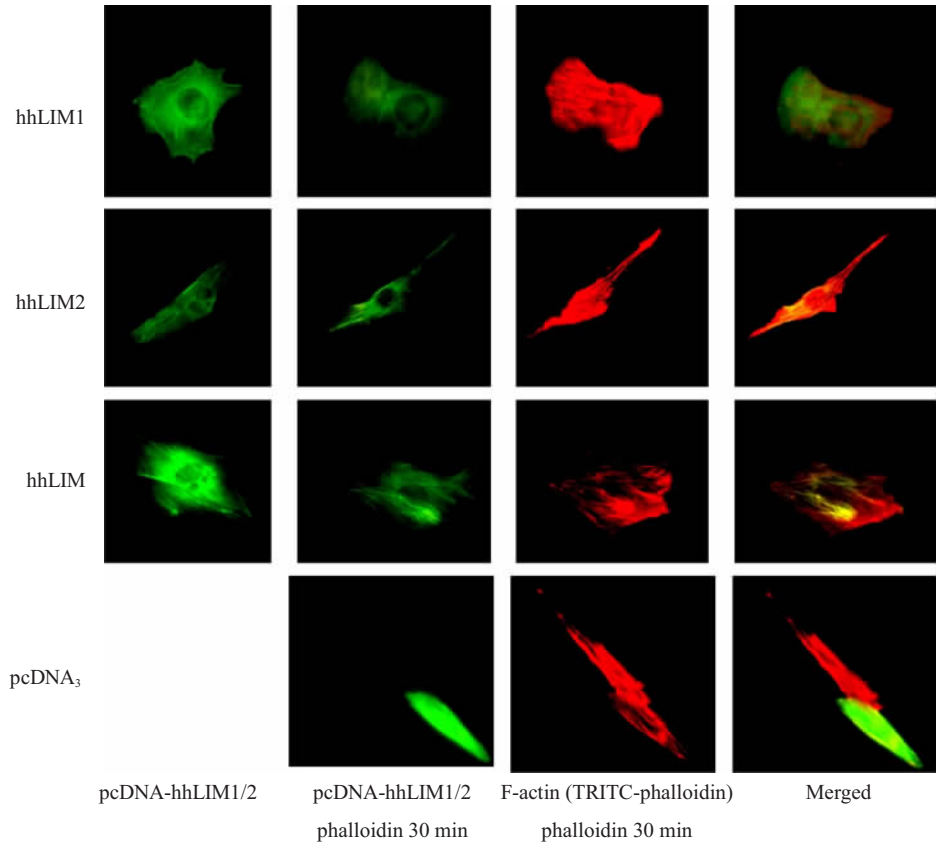


Fig. 3 Immunofluorescence analysis and colocalization of hhLIM and actin in C2C12 cells

C2C12 cells were transfected with pcDNA₃-hhLIM, pcDNA₃-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser,13^{Cys}→Ser) or pcDNA₃-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser,123^{Cys}→Ser) and stimulated with phalloidin for 30 min. The cells were fixed and stained with c-myc-tagged antibody and TRITC-phalloidin. hhLIM: C2C12 cells were transfected with pcDNA₃-hhLIM; hhLIM1: C2C12 cells were transfected with pcDNA₃-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser,13^{Cys}→Ser); hhLIM2: C2C12 cells were transfected with pcDNA₃-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser,123^{Cys}→Ser); pcDNA₃: C2C12 cells were transfected with pcDNA₃.

为了进一步探讨不同 LIM 结构域突变对 actin 动力学的影响, 用细胞骨架聚合剂鬼比环肽诱导 30 min 后观察 hhLIM 与 F-actin 之间的定位变化. 结果显示, 转染 pcDNA3-hhLIM 和 pcDNA3-hhLIM1(10^{Cys}→Ser,13^{Cys}→Ser) 表达质粒的细胞, hhLIM 在胞质中呈束状沿肌丝分布, 并随着鬼比环肽诱导的细胞骨架聚合而与 F-actin 共定位, LIM 结构域 2 突变则使 hhLIM 弥散分布于胞浆中, 鬼比环肽诱导虽使细胞骨架聚集成束, 但是 hhLIM 不再随骨架聚合而与 F-actin 共定位.

2.4 hhLIM 在体外具有交联 F-肌动蛋白的作用

以目前已知的具有 F-actin 交联作用的 SM22 α 为阳性对照, 以 BSA 为阴性对照, 利用 F-actin 交联试验观察 GST-hhLIM、GST-hhLIM1 和 GST-hhLIM2 在体外交联 F-actin 中的作用. 对反应上清(S)和沉淀(P)进行 SDS-PAGE 分析的结果(图 4)显示, 单独的 F-actin 几乎不能被离心沉淀下来, 即 F-actin 主要存在于上清(S)中, 加入 hhLIM 后, F-actin 可形成大的聚合物而产生沉淀, 沉淀(P)中 F-actin 显著多于上清(S), 提示 hhLIM 具有与 SM22 α 相同的交联 F-actin 的作用. 加入 LIM 结

构域 2 突变的 hhLIM2 后, 沉淀(P)中 F-actin 很少, 与对照 BSA 无明显区别, 说明 LIM 结构域 2 突变使 hhLIM 失去交联 F-actin 的能力. LIM 结构域 1 突变后仍保持一定的 F-actin 交联活性. 对交联的沉淀(P)进行电镜观察, 发现, hhLIM 和 SM22 α 与 actin 均可以形成束状纤维, 而 LIM 结构域 2 突变使 hhLIM 失去交联 F-actin 的能力(图 5).

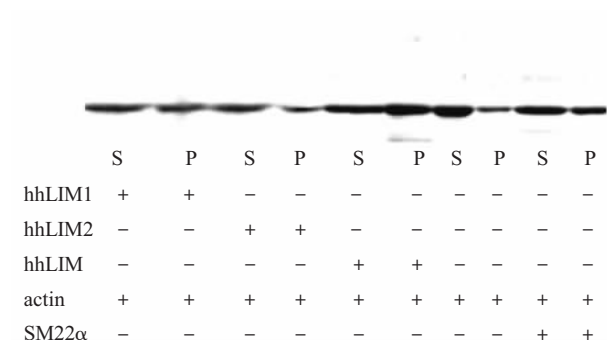


Fig. 4 Actin co-sedimentation assay shows the interaction between hhLIM and F-actin

Purified F-actin was incubated with GST-hhLIM or LIM domain-mutated hhLIM, respectively, for 30 min in F-actin buffer containing ATP and Ca²⁺ and then centrifuged at 10 000 *g* for 30 min. Cross-linked F-actin was pelleted by centrifugation and separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

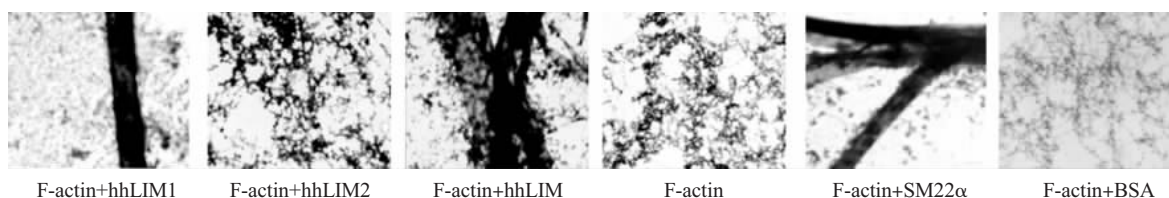


Fig. 5 Electron microscopy morphology of filaments assembled from hhLIM-actin complex

F-actin and GST-hhLIM or SM22 α or BSA were incubated together for 30 min in F-actin buffer containing ATP and Ca²⁺ and then centrifuged at 10 000 *g* for 30 min. Proteins in the pellets (P) were detected by electron microscopy.

2.5 LIM 结构域突变对细胞收缩功能的影响

对兴奋剂刺激产生收缩反应是分化型 C2C12 细胞的标志之一. 如图 6 所示, 用乙酰胆碱刺激转染 pcDNA₃-hhLIM 的细胞时, 细胞出现明显的收缩反应. LIM 结构域 1 突变后, 细胞收缩功能有所下降, 但与 hhLIM 相比无统计学差异, LIM 结构域 2 突变则使细胞收缩功能显著降低, 表明 LIM 结构域 2 与 actin 相互作用是细胞收缩的必要条件之一.

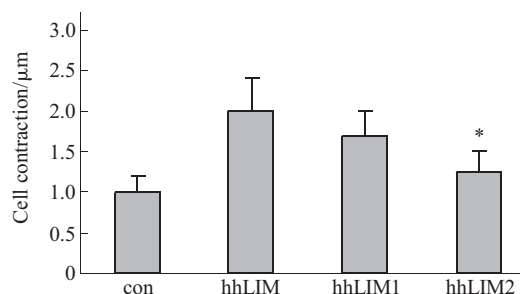


Fig. 6 Densitometry micrograph was performed of agonist-induced contraction of C2C12 cells transfected with pcDNA₃ (Con), pcDNA₃-hhLIM, pcDNA₃-hhLIM1 (10^{Cys}→Ser,13^{Cys}→Ser) or pcDNA₃-hhLIM2 (120^{Cys}→Ser,123^{Cys}→Ser)

**P* < 0.05 compared with C2C12 cells transfected with pcDNA₃-hhLIM plasmid.

3 讨 论

LIM 蛋白在细胞生命活动过程中起重要作用^[10~12]. hhLIM 是一种新近发现的含有 LIM 结构域的蛋白质, 属于 LIM-Only 家族. 虽然 LIM 蛋白家族成员之间有着极高的同源性, 但其功能却差异较大^[13]. CRP2/SmLIM 主要在血管平滑肌细胞中表达, 是血管平滑肌的一种标志蛋白, 与血管平滑肌细胞的发育与分化密切相关^[14]. CRP3/MLP 属于细胞双重定位蛋白, 它既可作为肌细胞生成的调控因子定位于核内, 又可在胞浆参与心肌和骨骼肌细胞骨架的形成, 是成肌分化的正调控因子^[15]. hhLIM 也是一个组织特异性蛋白质, 主要在心肌和骨骼肌组织中表达. 我们在以往的研究中发现, hhLIM 可以在胞浆与 actin 相互作用, 调节细胞骨架的组构^[16], 但目前还不清楚 hhLIM 与 actin 相互作用的结构域及相互作用的方式. 为进一步研究 hhLIM 与 actin 相互作用的机制与生物学意义, 本文用不同 LIM 结构域的突变体对 hhLIM 与 actin 相互作用的结构域进行了鉴定. GST-pull down 和 hhLIM 与 actin 细胞定位关系的免疫荧光分析结果表明, C 端的 LIM 结构域 2 是 hhLIM 与 actin 结合所必需的, 该结构域中的 2 个 Cys 置换为 Ser 可使 hhLIM 结合 actin 的功能完全丧失, 而 N 端的 LIM 结构域 1 突变只是使 hhLIM 结合 actin 的能力下降. 为了进一步确定 C 端的 LIM 结构域 2 是否直接和 actin 相互作用, 我们将 LIM 结构域 2 突变体融合蛋白在体外与 actin 纯品进行交联实验, 结果证实, hhLIM 通过 LIM 结构域 2 与 actin 直接结合并起到交联 F-actin 的作用. 本文结果表明, hhLIM 的两个 LIM 结构域各司其职, 相互独立地完成各自的功能, 其中 LIM 结构域 2 在 hhLIM 调节 actin 细胞骨架组构中起决定性作用.

心肌肥厚是心脏适应血流动力学超负荷而增加工作能力的一个基本过程. 心肌细胞的骨架系统在维持细胞形态和心肌肥大的发生中起着关键性作用. Actin 是细胞骨架的基本结构成分, 兼有支架和收缩双重功能. LIM 蛋白是一类富含半胱氨酸且分子结构中具有一个或多个锌指结构的蛋白质家族, 该家族中的蛋白质分子都含有特征性的氨基酸保守序列(CX₂CX_{17~19}HX₂CX₂CX_{16~20}CX₂C/H/D), 即 LIM 结构域. LIM 结构域中半胱氨酸、组氨酸残基形成具有 Zn²⁺ 结合口袋的稳定的三级结构, 该结构域通过与 actin 和转录因子等重要结构和功能蛋白的

相互作用, 使心肌细胞的形态结构和基因表达处于正常状态. 富含半胱氨酸的 LIM 蛋白(cysteine rich LIM proteins, CRPs)家族的功能是与斑联蛋白和其他细胞骨架蛋白, 如 α -辅肌动蛋白结合, 调节细胞骨架的结构和肌细胞的分化. MLP (muscle LIM protein) 在心肌中与粘着斑蛋白和 myomesin 相互作用, 起维持细胞骨架稳定和介导信号转导的作用^[16]. Lmk1(LIM kinase 1)可以通过 LIM 结构域激活血清效应因子, 并进而调节肌特异性表达基因的转录, 这种激活作用不依赖于血清而与 actin 的动力学改变有关^[17]. PINCH 可以通过其 LIM 结构域 1 与 ILK 的锚蛋白重复序列结合, 通过 LIM 结构域 4 与 NCK2 的 SH3 结构域相互作用^[18]. hhLIM 在心肌中含量丰富, 可以通过直接与 actin 结合起到调节细胞骨架组构及肌细胞分化的作用. 我们的研究发现, LIM 结构域 1 突变后, hhLIM 虽然还可以与 F-actin 共定位, 但却丧失了诱导细胞肥大的能力, 由此提示, hhLIM 启动心肌肥大的分子机制可能与 LIM 结构域 1 有关, 但 LIM 结构域 1 在心肌肥大中的具体作用及机制还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Kadrmas J L, Beckerle M C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5** (11): 920~931
- 2 陈光慧, 周子振, 张继峰. 应用三元递减法筛选特异性心脏生长相关基因. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (3): 295~300
- Chen G H, Zhou Z Z, Zhang J F. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (3): 295~300
- 3 Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* Hhlim is involved in cardiac hypertrophy. *Biophys Biochim Acta*, 2004, **1690** (1): 1~10
- 4 郑斌, 温进坤, 韩梅, 等. hhlim 基因表达产物的亚细胞定位及其在细胞肥大中的意义. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 67~71
- Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 67~71
- 5 郑斌, 温进坤, 韩梅, 等. hhlim 对心肌肥大的影响及其作用机制探讨. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (3): 427~430
- Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (3): 427~430
- 6 Twizere J C, Lefebvre L, Collete D, *et al.* The Homeobox protein MSX2 interacts with tax oncoproteins and represses their transcription activity. *J Biol Chem*, 2005, **280** (33): 29804~29811
- 7 Autieri M V, Kelemen S E, Wendt K W. AIF-1 is an actin-polymerizing and Rac1-activating protein that promotes vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*, 2003, **92**:1107~1114
- 8 郑斌, 温进坤, 史建红, 等. hhLIM 的表达及其在 F-actin 蛋白交

- 联中的作用. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, **22** (5): 379~383
- Zheng B, Wen J K, Shi J H, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2006, **22** (5): 379~383
- 9 Han M, Wen J K, Zheng B, *et al.* Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, **291** (1): C50~C58
- 10 Han M, Wen J K, Zheng B. Roles of LIM proteins in cardiac hypertrophy. Future Cardiol, 2005, **1** (3): 319~329
- 11 Zheng B, Wen J K, Han M. Factors involve in the cardiac hypertrophy. Biochemistry (Moscow), 2003, **68** (6): 650~657
- 12 Zheng B, Wen J K, Han M. hhLIM is involved in cardiomyogenesis of embryonic stem cells. Biochemistry (Moscow), 2006, **71** (1): S71~S76
- 13 Weiskirchen R, Gunther K. The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by Connecting. BioEssays, 2005, **25**:152~162
- 14 Wei J, Gorman T E, Liu X, *et al.* Increased neointima formation in cysteine-rich protein 2-deficient mice in response to vascular injury. Circ Res, 2005, **97** (12):1323~1331
- 15 Barash I A, Mathew L, Lahey M, *et al.* Muscle LIM protein plays both structural and functional roles in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, **289** (5): C1312~1320
- 16 郑 斌, 温进坤, 韩 梅. 细胞肥大过程中 hhlim 的亚细胞定位变化及其对细胞骨架的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, **21** (4): 255~261
- Zheng B, Wen J K, Han M. Chin J Biochem Mol Biol, 2005, **21**(4): 255~261
- 17 Louis H A, Pino J D, Schmeichel K L. Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. J Biol Chem, 1997, **272**: 27484~27491
- 18 Ohashi K, Hosoya T, Takahashi K, *et al.* A Drosophila homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. Biochem Biophys Res Commun, 2000, **276**: 1178~1185
- 19 Legate K R, Montanez E, Kudlacek O, *et al.* ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, **7** (1): 20~31

Interaction Between hhLIM and Actin Depends on LIM Domain 2 at The C-terminus of hhLIM*

ZHENG Bin, WEN Jin-Kun**, HAN Mei, SHI Jian-Hong

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract hhLIM, a member of LIM protein family, has two LIM domains and plays an important role in gene regulation, cytoskeleton organization and cell hypertrophy. To understand the functional importance of hhLIM in cytoskeleton organization and muscle hypertrophy, hhLIM and its mutants of two LIM domains were constructed and function of each LIM domain and its interaction with actin were studied. GST pull down assay and immunofluorescence assays showed that LIM domain 2 at the C-terminus of hhLIM is critical for its interaction with actin. The mutant of the LIM domain 2 in which two important Cys are replaced by Ser lost the capacity of hhLIM to interact with actin. Mutation of the LIM domain 1 at the N-terminus of hhLIM impaired the capacity of hhLIM to interact with actin. F-actin cross-linking assay identified that hhLIM could make F-actin to cross-link into bundles by interaction between LIM domain 2 and actin. In conclusion, LIM domain 2 at the C-terminus of hhLIM plays a central role in F-actin polymerization and cytoskeleton stabilization, whereas the first LIM domain is essential for the nuclear localization of hhLIM.

Key words hhLIM, LIM domain, cell localization, cytoskeleton organization

*This work was supported by grants from Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-05-0261), Key Project of Chinese Ministry of Education (206016), The National Natural Science Foundation of China (30300132), and Hebei Natural Science Foundation of China (2004000644).

**Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: wjk@hebmhu.edu.cn

Received: September 18, 2006 Accepted: September 30, 2006