T-STAR 的结构及生物学功能

陈 兵* 郭 莲 张 玲 何风田[1]

(第三军医大学西南医院内分泌科；[1]第三军医大学生物化学教研室，重庆 400038)

摘要 T-STAR 基因定位于染色体 8q24.2，其表达产物为分子量约 55 kDa 的 Sam68 样蛋白，是 STAR (signal transduction and activator of RNA)家族新成员，具有 RNA 结合蛋白特征性的结合位点和酪氨酸磷酸化功能域。可能通过酪氨酸激酶信号转导系统和 pre-mRNA 的选择性剪接、加工等途径，参与了精子的发生、细胞的增殖调控、转化细胞的永生化过程并可能与某些疾病有关。

关键词 信号转导；RNA 结合蛋白；选择性剪接；精子发生

T-STAR 是 STAR (signal transduction and activator of RNA)家族新成员，系分子量约 55 kDa 的 Sam68 样蛋白，作为一种 RNA 结合蛋白，T-STAR 可通过酪氨酸激酶信号转导和pre-mRNA的选择性剪接、加工等过程而参与精子发生、细胞增殖调控及某些疾病的发生发展过程。

GenBank 上提交的不同名称的 T-STAR 及其 DNA 编码序列有：SLM-2 (Sam68-like mammalian protein, AF099092)[1]，T-STAR (testis-signal transduction and activator of RNA, AF069681)[2]; Salp α (Sam68-like protein α, AF051321)[3]，其小鼠同源蛋白为 ÉTOILE (AF079763)[4]。最近，GenBank 又将其全名写为 KHDRBS3(KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3)，以取代 Etle、SALP、SLM2、SLM-2、T-STAR、etoile 等众多不同的称呼。本文考虑到名称 T-STAR 使用较早且较为广泛而仍予沿用。

1 基因序列特点

T-STAR 基因定位于染色体 8q24.2，其 STS 标记为 SGC30203，其微卫星标记为 D8S529~D8S1710 (145.9~149.8 cM)[3]。T-STAR 的 cDNA 片段大小为 1.2~1.9 kb 左右，含 9 个外显子[2]。起始蛋氨酸编码序列为 GCGAGCG，有一个 394 个核苷酸的 5'-UTR (非翻译区)中，富含 GC (约 83%)[5]。TGA 终止密码后有一个 426 个核苷酸的 3'-UTR 区，该区末尾 poly(A)[3]。小鼠 ÉTOILE cDNA 片段大小为 1.5~2 kb，全长 40 kb，与人 T-STAR 有 99.4% 相同，含有 5 个外显子，开放阅读框内有 346 个氨基酸残基[2]，但有人认为起始 AUG 之后无明确的终止密码，可能为大 ORF 结构[1]。T-STAR mRNA 长度至少 2.4 kb。

2 结构和功能域

T-STAR 属 STAR 蛋白家族，结构上与其他 STAR 家族成员，尤其与 SAM68 (Src-associated in motosis, 68 kDa)高度相似[6,7]。小鼠 ÉTOILE 蛋白仅 160 位氨基酸与人 T-STAR 不同[1]。

T-STAR 有一特征性的 STAR 功能域，由一 KH (hnRNP K homology)结构及其两侧QUA1 (Quaking1)和 QUA2 (Quaking2)序列组成。STAR 功能域又称 GSG(GRP33, Sam68, GLD-1)结构或 SGQ (Sam68/GLD1/Quaking)结构，是 STAR 家族成员的共同特征，含 200 个氨基酸残基，系 RNA 结合的位点[2]。其中的 KH 结构为具体的 RNA 结合域，但线性排列的KH结构较原型有所延伸,形成独特的KH功能环[8]，其两侧的保守序列(QUA1, QUA2等)也都位于此功能环内[4]。

KH 结构和QUA1 序列参与了 T-STAR 的自身结合及与其他 STAR 蛋白的相互结合[8]。自身结合引起了螺旋结构的形成。突变的 E128G 蛋白会导致螺旋形成明显减少，但对 RNA 结合活性和自身结合力无较大影响[8,9]。聚脯氨酸位点为 SH3 结合位点。精氨酸 - 甘氨酸重复序列为精氨酸甲基化位点[10]。富酪氨酸区为 SH3 和 WW 结合位点[11]。酪氨酸为磷酸化酪氨酸位点，磷酸化酪氨酸是与 SH2、PTB 结构蛋白的结合位点[1]。提示 T-STAR 还是 SH3、SH2、WW 结合蛋白和精氨酸甲基化酶和酪氨酸激酶的底物。

收稿日期：2005-10-08 接受日期：2006-02-16

国家自然科学基金资助项目(No.30271442, No.39980010)

*通讯作者。Tel/Fax: 023-68754138, E-mail: cb@mail.tmmu.com.cn

T-STAR 含有的 RASH 结构是在 RBM 蛋白家族中的一段保守序列，如 hnRNP-G、Sam68、Salp 等均含有此结构，其中研究较多的是 Sam68。其与 RNA 的结合有赖于 RASH 结构中一个或多个酪氨酸磷酸化位点的调控。推测 RBM 蛋白家族的 RNA 结合过程也是由 RASH 结构中的磷酸化酪氨酸调控的[3]。T-STAR 还有一个选择性剪接异构体，即 Salp，与前者相比，Salp 缺少富含酪氨酸的 C 末端[3]。

3 相互作用

在 KH 结构和 QUA1 序列作用下，T-STAR 能与自身及其他 STAR 蛋白(如 Sam68 等)相互结合，形成同 / 异源多聚体。由于 T-STAR 的 RNA 结合部份与 Sam68 的不同，T-STAR/Sam68 异源多聚体可能与其自身同源多聚体有着不同的 RNA 结合特点。如 T-STAR 虽能与异源多聚 RNA poly(A)和 poly(G)结合，但与 poly(G)的亲合力更强[1]。

体外实验表明，T-STAR 主要与 RBM 结构蛋白和 SH2/SH3 结构蛋白发生特异结合[6]。如 hnRNP G-T 属 RBM 结构蛋白，系 pre-mRNA 选择性剪接激活物。T-STAR 与 hnRNP G-T 的相互作用进一步说明 T-STAR 的功能与 pre-mRNA 选择性剪接密切相关。

聚脯氨酸位点为 SH3 结合位点。STAR 蛋白家族的聚脯氨酸位点分为两种：class I (RXXPXXP)和 class II(PXXPXR)[1]，均能与 SH3 结合。SLM-2 的聚脯氨酸模体(RPPPPPPT)是 class I 结构，不能与 p59fyn、PLC-1、p120rasGAP 的 SH3 结合。同时，由于没有 PPXY 模体，不能与的 WW 结构蛋白 YAP 等结合[11]。T-STAR 的 C 末端有一个 Grb2 SH2 结合位点，可与 Grb2 相互结合[1]。

免疫共沉淀反应表明 T-STAR 能与 I_A PI 3 激酶 p85 亚单位的 SH3 结合，但不与 Src、Abl、Crk、Spectrin 及 PLC 1 的 SH3 结合[3]。对此目前认为，T-STAR 的聚脯氨酸位点(^{255}RPPPPPP^{261})与 p85 亚单位 SH3 位点的首选配体结构(R*x*LP*xx*P)一致。同时，Lee 等[3]认为 T-STAR 的 C 末端富含酪氨酸区对聚脯氨酸位点的 SH3 结合活性有抑制作用，因为当 T-STAR 在 v-Src 转染的 CEF 细胞中呈磷酸化状态时，与未发生磷酸化时相比，SH3 的结合量下降了 2 倍。

4 组织细胞分布

Northern 印迹分析表明：T-STAR 的 mRNA 广泛分布于视网膜，胎肝、睾丸、前列腺、心脏、肺、胰腺、胎盘等组织中，在睾丸中表达最高，脑和骨胳肌其次，其他组织表达较弱[1]。小鼠的组织分布与人相同，小鼠肾脏不表达，神经组织有低水平表达[6]。有学者在寻找区分骨髓间充质干细胞和成纤维细胞特征性分子标志时，发现 T-STAR 在骨髓间充质干细胞中的表达要低于成纤维细胞，原因仍在进一步研究之中[12]。

5 生物学功能

5.1 信号转导与 pre-mRNA 选择性剪接

STAR 成员多具有与信号转导有关的功能域，如 SH3 和 WW 结合位点等[4]。实验证明，STAR 家族通过信号转导和 RNA 代谢途径在不同的组织和动物种系发挥不同的功能，如参与胚胎形成和髓鞘形成[13]，果蝇肌肉发育[14]，线虫的胚胎发育等[15]。T-STAR 的发现说明 Sam68/SLM 家族可能也参与 RNA 代谢过程中的信号转导。进一步研究发现这种信号转导可能与pre-mRNA加工和特异性剪接位点的选择性调节有关。Stoss 等[16]通过酵母双杂交，免疫共沉淀等方法发现鼠 T-STAR 同源蛋白 rSLM-2 与多种选择性剪接有关的蛋白质有相互作用，如富含丝 / 精氨酸的 SRp30c 蛋白、剪接结合因子 YT521-B、骨胳附着因子 B 等，因此认为 rSLM-2 是一种新的剪接调节蛋白。 转染实验表明，rSLM-2 可影响 CD44v5、人转化子 2 及 tau 微小基因等的剪接方式，因此认为 rSLM-2 和 Sam68 均在信号转导中起着蛋白质适配器的作用，且是信号转导通路和前 mRNA 加工处理的中间环节，可能通过自身 3'-UTR 与靶 mRNA 结合而调节 RNA 代谢[17]。

在减数分裂中起重要作用的信号转导蛋白有 Src[1]、Raf-1[18]、MKK[19]和 MAP 激酶[19,20]等。Sam68 既是 Src 激酶底物，也是丝氨酸 / 苏氨酸激酶 Cdc2 的底物[21]。由于 T-STAR 含有 Cdc2 磷酸化位点 S/TP，因此也可能是 Cdc2 的底物。

Di Fruscio 等[1]还观察到 T-STAR 能与 Sam68 在成纤维细胞中发生免疫共沉淀，据此推测 T-STAR/Sam68 异源多聚体在信号转导和 RNA 结合过程中起着不同的作用。

5.2 磷酸化调控

T-STAR 功能活性受酪氨酸磷酸化调控，但其单体或同/异源多聚体的磷酸化调节过程目前还不十分清楚。比较明确的证据是 T-STAR 能与 Sam68 或 I_A PI 3 激酶 p85 亚单位的 SH3 结合，并受其自身 C

末端富含酪氨酸区的磷酸化调控[3]。

活性 I_A PI 3 激酶参与了多数细胞从 G_0 期转入 S 期的调控过程[22]。活性 I_A PI 3 激酶是异二聚体，由调节亚单位 p85 和催化亚单位 p110 组成，p85 对 p110 的活性及其在细胞内的定位起调节作用。两个 p85-SH2 与酪氨酸激酶磷酸化受体相互结合后，p85/p110 复合物回到胞膜的底物聚积处，并增强 PI 3 激酶的活性[23]。除对 p110 起调节作用外，p85 还在活性 PI 3 激酶依赖性氧化应激诱导的凋亡过程中起着重要作用[24]，p85 还能通过底物的聚脯氨酸位点与 Grb2 的 SH3 结合，故 p85 是在活性 PI 3 激酶依赖下的信号转导接受蛋白[25]。

在 Rous 肉瘤病毒转染的鸡胚成纤维细胞(RSV-CEF)中，p85 亚单位作为 v-Src 激酶的底物，可经激酶的 SH2 及 SH3 而与 v-Src 结合[26]。T-STAR 的酪氨酸在 RSV-CEF 中呈磷酸化状态，但却不能与 v-Src 激酶结合，说明不是 v-Src 激酶的直接作用，而是通过与 p85 亚单位结合而间接被 v-Src 激酶磷酸化。p85 的 SH3 与 T-STAR 的聚脯氨酸位点结合后，一部份聚脯氨酸位点从 p85 上释放出来，与 Src 的 SH3 结合，Src 活化的同时也使 T-STAR 磷酸化[3]。

另有学者推测 T-STAR 可能象其他核内定位 RNA 结合蛋白一样在细胞质与细胞核之间穿梭，或者作为核内酪氨酸激酶如 abl 等底物而发生磷酸化[1]。

5.3　细胞增殖抑制及与细胞永生化的关系

一般而言，T-STAR 是一种细胞增殖抑制蛋白[27,3]。用 T-STAR 基因转染 VH10/SV 永生化细胞和鸡胚成纤维细胞，可使细胞克隆数明显下降。而用缺失 RNA 结合域的 T-STAR 基因转染则无此作用。Sam68 一种细胞生长调节蛋白，对细胞生长起着促进作用[28]。Lee 等[3]在 CEF 中观察到 T-STAR 有下调 Sam68 表达的作用。Sam68 作为 Src 酪氨酸激酶的主要底物而在细胞分裂中有着重要作用，而 Sam68 的下调正好会打断细胞周期进程，抑制细胞生长。而且，Sam68 的选择性剪接异构体，Sam68 KH，可通过下调 cyclin D1 而抑制细胞增殖[29]。由于T-STAR与pre-mRNA的加工和特异性剪接位点的选择性调节有关[16]，T-STAR 的过度表达将会引起不同剪接模式，以致异常 mRNAs 增多，受其调控的与细胞生长有关的蛋白质编码 mRNAs 不能翻译，细胞生长由此受到抑制。据此推测，T-STAR 可能通过对 Sam68 的 pre-mRNA 进行选择性剪接而抑制 Sam68 的表达。

从组织分布上看，T-STAR/SLM-2/Salp 蛋白的组织分布与其生长抑制作用一致的。T-STAR/SLM-2/Salp 在脑和骨胳肌中较高表达，在胎盘、肝脏、肺脏等组织中呈低表达，可能是由于脑和骨胳肌中几乎没有分裂细胞的缘故[3]。

正常人体细胞分裂的次数是有限的，即“海弗利克极限”，超过了这个极限，细胞将进入“衰老”。端粒是染色体末端的结构，起着稳定染色体并防止其末端融合的作用，并随着细胞分裂次数增加而逐渐缩短，缩短到临界长度时，就会启动衰老机制,因此可能是复制性衰老的“计数器”[30]。通常情况下，T-STAR 的表达水平在正常细胞，衰老前各期细胞中无明显差异。Kool 等[27]对 SV-40 转化人成纤维细胞永生化前和永生化不同状态下基因表达差异进行分析，发现 T-STAR 在 SV-40 转化的永生化人成纤维细胞(VH10/SV)中表达下调，且这种低表达或表达缺失不仅限于SV40转化的细胞永生化细胞中，也出现其他转化表型的细胞系中。故 T-STAR的表达下调在由癌基因等介导的转化永生化过程中普遍存在。

有实验表明，认为 T-STAR 的下调可能是细胞跨越“衰老”危机点后维持永生化状态的必要条件[28]。相同的结果也出现在 Lee 等[3]的实验研究中。T-STAR的表达下调仅仅出现在从伴随了大量细胞死亡的细胞增殖危机中分离出来的永生化细胞克隆中，即T-STAR仅在跨越了增殖危机的永生化细胞中才出现表达下调。提示 T-STAR 可能是细胞增殖危机通路或永生化通路的重要组分之一[31]。

绝大多数永生化细胞系都有端粒酶活性。端粒酶可稳定端粒长度，使细胞维持增殖状态而不进入“衰老”[32]，因此在细胞永生化过程中起着重要作用。有趣的是，T-STAR 和端粒酶不仅均与细胞永生化过程有关，且也均与精子发生有关。T-STAR 的表达水平在精子发生的最后阶段明显增加，而此时端粒酶的活性却显著下降[2]。磷酸化调节是端粒酶活性调控的重要方面[33]，而 T-STAR 又是酪氨酸激酶信号转导通路重要成分，因此可推测 T-STAR 与端粒酶活性之间可能有一定相关性。近期我们[33,34]陆续发现 T-STAR 与端粒酶催化亚单位有相互作用并对肿瘤细胞中的端粒酶活性有调控作用，进一步证实了上述推测。

5.4　与精子发生的关系

RNA 结合模体(RNA-binding motif, RBM)是仅在

有转录活性的雄性生殖细胞中表达的RNA结合蛋白，它在精子形成和分化中起着重要作用，其编码基因RBMY的微小缺失就会引起男性不育[6]。Venables等[2]利用睾丸cDNA文库进行酵母菌双杂交筛选试验，发现RBM能与T-STAR发生特异性结合，结合位点为RBM的SRGY重复序列。进一步研究发现T-STAR还参与了RBM的调控。

一方面，T-STAR作为pre-mRNA选择性剪接调控蛋白主要在雄性生殖细胞核中表达，且在减数分裂的晚期粗线期表达最高；融合的GFP-T-STAR聚积于核周隙(PNC)中，较多的特异性转录子如hnRNP I/PTB，由聚合酶III转录的富含嘧啶的小RNA分子[35]，螺旋体[36]，SMN[37]等也都聚积于该区。因此，T-STAR/SLM-2/Salp聚积区可能是特异性per-mRNA序列转录区。另一方面，RBM在减数分裂的各期均有表达；RBM的序列有几个与pre-mRNA有关的特点：不仅与hnRNP[38]非常相似，而且其RNA结合位点(RRM区)富含RS-SR二肽的结构，这种结构最初为丝氨酸-精氨酸(SR)蛋白剪接因子[39]所特有。以上说明T-STAR/SLM-2/Salp通过对RBM的pre-mRNA的加工而参与了精子发生过程。

6 与疾病的关系

由于T-STAR基因位于染色体8q24上ECA1区，从D8S2049到D8S1753的范围内，该区有较多运动、感觉神经相关的基因，而且T-STAR除在睾丸表达外，还在脑、骨胳肌大量表达，因此推测T-STAR可能参与一些神经肌肉系统疾病的发生发展过程，如定位于8q24上ECA1区的遗传性运动、感觉神经病变(HMSNL)[40]。Sugimoto等[7]曾怀疑T-STAR可能与定位于ECA1区的儿童失神性癫痫(CAE)的发病有关，但在目前对CAE家系的突变分析研究工作中尚未找到有力的证据。另一个有待深入研究的是与蛋白尿相关性疾病的关系，Cohen等[41]通过数字微分显示技术(digital differential display)发现，T-STAR依赖性血管内皮生长因子的选择性剪接可能对维持肾小球的滤过功能是重要的。

如前所述，T-STAR参与酪氨酸激酶信号转导系统和pre-mRNA的选择性剪接、加工等重要的生理过程，已发现与精子发生和细胞增殖调控、端粒酶活性及转化细胞永生化有关，因此可能会涉及到一些男性生殖异常性疾病和衰老相关的疾病，如因精子异常而导致的男性不育症和细胞增殖异常相关的肿瘤、骨质疏松等增龄性疾病。选择性剪接是真核生物控制基因表达的一种重要机制，生物体通过这种机制使有限的基因得以表达大量复杂的蛋白质而发挥作用[42]。这种转录后加工的过程明显地扩大了基因编码蛋白质的能力。在人类，60%以上基因通过选择性剪接发生产生大量可能有非常重要的生理或病理意义的蛋白质[2]。目前发现基因点突变导致的遗传性疾病大约有15%通过选择性剪接而发生，已经鉴定60多种激酶和大量的神经组织蛋白都存在剪接变构体[41]。有学者预测，选择性剪接的相关蛋白质将在治疗药物、药物靶点和诊断标记中扮演着重要的角色。尽管目前对T-STAR研究工作才刚刚开始，但其作为一种重要的选择性剪接调控蛋白已为公认，深入的研究将揭示其在疾病发生发展和诊治中的作用和地位。

参考文献 (References)

[1] Di Fruscio M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 2710
[2] Venables JP *et al. Hum. Mol. Genet*, 1999, **8**: 959
[3] Lee JS *et al. Gene*, 1999, **240**: 133
[4] Vernet C *et al. Trends Genet*, 1997, **13**: 479
[5] Wong G *et al. Cell*, 1992,69: 551
[6] Venables JP *et al. Hum Mol Genet*, 2000, 9: 685
[7] Sugimoto Y *et al. Epilepsy Res*, 2001, 46: 139
[8] Chen T *et al. Mol Cell Biol*, 1997, 17: 5707
[9] Lin Q *et al. J Biol Chem*, 1997, 272: 27274
[10] Gary JD *et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998, **61**: 65
[11] Sudol M *et al. Prog Biophys Mol Biol*, 1996, **65**: 113
[12] Ishii M *et al. Biochim Biophys Res Commun*, 2005, **332**: 297
[13] Justice MJ *et al. Genet Res*, 1988, **51**: 95
[14] Baehrecke EH. *Development*, 1997, **124**: 1323
[15] Francis R *et al. Genetics*, 1995, **139**: 579
[16] Stoss O *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 8665
[17] Itoh M *et al. Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 5452
[18] Laird AD *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 26742
[19] Shapiro PS *et al. J Cell Biol*, 1998, **142**:1533
[20] Zecevic M *et al. J Cell Biol*, 1998, **142**: 1547
[21] Resnick RJ *et al. Oncogene*, 1997, **15**: 1247
[22] Toker A *et al. Nature*, 1997, **387**: 673
[23] Fruman DA *et al. Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 481
[24] Yin Y *et al. Nature*, 1998, **391**: 707
[25] Carpenter CL *et al. Biochim Biophys Acta*, 1996, **1288**: M11
[26] Haefner B *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 7937
[27] Kool J *et al. Cell Growth Differ*, 2001, **12**: 535
[28] Barlat I *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 3129
[29] Sherr CJ *et al. Cell*, 2000, **102**: 407
[30] Ulaner GA *et al. Int J Cancer*, 2001, **91**: 644
[31] Colgin LM *et al. Curr Opin Genet Dev*, 1999, **9**: 97
[32] Li H *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 16729

[33] 张　玲等。*第三军医大学学报*, 2005, **27**: 1127
[34] 张　玲等。*世界华人消化杂志*, 2005, **13**: 1267
[35] Huang S *et al*. *J Cell Biol*, 1997, **137**: 965
[36] Lamond AI *et al*. *Science*, 1998, **280**: 547
[37] Liu Q *et al*. *EMBO J*, 1996, **15**: 3555
[38] Delbridge ML *et al*. *Nat Genet*, 1997, **15**: 131
[39] Birney E *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 5803
[40] Kalaydjieva L *et al*. *Nat Genet*, 1996, **14**: 214
[41] Cohen CD *et al*. *J Am Soc Nephrol*, 2005, **16**: 1958
[42] Donner K *et al*. *Eur J Hum Genet*, 2004, **12**: 744

Structure and Biology Function of T-STAR

Bing Chen*, Lian Guo, Ling Zhang, Feng-Tian He[1]
(*Endocrinology Department of Southwest Hospital,* [1]*Biochemistry Institute, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China*)

Abstract　The gene of T-STAR is located in chromosome 8q24.2. Its expression product is about 55 kDa Sam68 analog — a new member of STAR family. T-STAR is an RNA-binding protein that has an RNA-binding domains and function region of tyrosine phosphorylation. T-STAR has been shown to be involved in spermatogenesis, regulation of cell proliferation or immortalization of transform cell by the pathways including tyrosine kinase signal transduction and pre-mRNA alternative splicing or activation of RNA. It is also thought to be related with some diseases.

Key words　signal transduction; RNA-binding protein; alternative splicing; spermatogenesis

Received: October 08, 2005　Accepted: February 16, 2006
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30271442, No.39980010)
*Corresponding author. Tel/Fax: 86-23-68754138, E-mail: cb@mail.tmmu.com.cn