

敲除 Sam68 基因导致白血病细胞系 细胞生长迟缓和 G2/M 期延长*

李庆华 庞天翔** 韩忠朝

中国医学科学院
(中国协和医科大学 血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 RNA 结合蛋白 Sam68 是细胞有丝分裂期 Src 酪氨酸磷酸化的靶蛋白. 尽管确切机制尚不清楚, 一些人还是认为 Sam68 可通过调控 RNA 的代谢参与细胞周期调控. 利用基因打靶技术, 在 DT40 细胞分离出 Sam68 基因缺失的细胞系. 利用该细胞系, 进行 Sam68 的功能解析. 与野生型细胞系相比, Sam68 基因缺失细胞表现出明显的生长速度迟缓. 通过细胞周期研究揭示, 这些细胞生长速度延迟是由于细胞周期中的 G2/M 期延长. 因为参与细胞周期 G2/M 期调控的周期因子 Cdc2 激酶的活性没有改变, 所以提示 Sam68 不依赖于 Cdc2 激酶的活性参与细胞周期中 G2/M 期调控.

关键词 Sam68, RNA 结合蛋白, 基因打靶, 细胞周期

学科分类号 Q253, Q279

Sam68 属于 RNA 结合蛋白 STAR 家族成员 (signal transduction and activation of RNA)^[1]. STAR 家族的成员均含有 GSG 同源结构域, 其中包含保守的 KH 结构域. KH 结构域的功能是结合 RNA^[2-4]形成二聚体^[5,6]. 在小鼠、果蝇以及线虫体内, STAR 家族中 KH 结构域的突变均可导致一系列发育障碍^[7,8].

Sam68 是 c-Src 有丝分裂期磷酸化的特异性靶蛋白, 它与细胞内的许多信号分子相关, 例如 Src^[9-11]、Fyn^[11]、Lck^[11]、Grb^[11,12]、PLC γ ^[11-13]、PI3K^[11,14]、Nck^[15]和 Jak3^[11,16]. 最近研究显示, 当 Sam68 在体外被酪氨酸磷酸化后其结合 RNA 的能力降低, 而 Sam68 的功能是作为一个多功能的 Src 激酶接头蛋白^[17], 由此提示 Sam68 在信号传导以及 RNA 代谢中发挥着重要的作用. 一个被自然剪切所形成的 Sam68 亚型, 由于其 KH 结构域缺失了 39 个氨基酸, 由此导致细胞生长迟缓, 并且此亚型的过度表达能导致细胞生长抑制^[18]. 这些结果提示了 Sam68 还有调控细胞生长的功能作用.

本文报道, 利用基因重组技术在鸡 B 淋巴细胞白血病细胞系 (DT40 细胞系), 成功地敲除 Sam68 基因, 用该细胞系进行 Sam68 功能研究. 结果显示 Sam68 基因缺失细胞的生长速度明显慢于野生型细胞, 进一步研究揭示, 生长速度的延迟是由于细胞周期 G2/M 期延长. 但是 Sam68 基因缺失细胞系调节细胞周期 G2/M 期的主要因子 Cdc2 激

酶活性却未发现变化. 研究结果揭示 Sam68 参与细胞周期的 G2/M 期的调控, 这种调控与 Cdc2 激酶的活性无关.

1 材料和方法

1.1 鸡 Sam68 cDNA 及其基因组 DNA 的分离

应用 RT-PCR 技术, 上游引物为 5' GGATTTA TTTTCTCATAAGAACATG 3', 下游引物为 5' TG GATCTGCATGTCTTCATTGAAGTC 3', 以 DT40 细胞总 RNA 为模板逆转录出一个 0.7 kb 的 Sam68 cDNA. 将其作为探针在 λ ZAP DT40 中做 cDNA 文库筛选. 用 helper M13 噬菌体再感染方法从杂交细菌中获得了一个含有 2.4 kb cDNA 片段的质粒克隆. 用对应上述 cDNA 片段 5' 及 3' 的非翻译序列的引物为 5' GTCCTTCCGGCCCTCACTTCC 3' 和 5' CCTGTTGCTTTGCCACACCCAGACAAGTAA 3', 以 DT40 基因组 DNA 为模板用 PCR 方法扩增出 9.2 kb 的基因组 DNA 片段, 继之再克隆到 pGEM-T 载体中 (Stratagene, San Diego, CA, USA).

*天津市科委应用基础基金资助项目(05YFJMJC02400).

** 通讯联系人.

Tel: 022-27307938-3112, Fax: 022-27306542

E-mail: tianxiangpang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-01-13, 接受日期: 2005-04-26

1.2 细胞培养以及基因敲除

将野生型的 DT40 细胞及其突变体细胞培养在含 10% 小牛血清、1% 鸡血清、及 50 mmol/L 2- 巯基乙醇的 RPMI1640 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育。

靶载体 CSG-bsr 和 CSG-his 的构建, 是用表达杀稻瘟菌素 Bsr (blasticidin S) 和 His (L-hisidinol) 抗药基因, 来取代含有编码鸡 Sam68 氨基酸残基 179~321 的外显子基因组 DNA 片段。将 25 μg 的 CSG-bsr 用限制性内切酶 *Sal* I 消化成为线性, 利用电穿孔方法 (550 V, 25 μFD) 将其转染到 DT40 细胞中, 随后用 50 mg/L Bsr 进行药物筛选, 从阳性克隆细胞中提取基因组 DNA, DNA 印迹分析以鉴定单体突变克隆。用同样方法再将 25 μg 线状 CSG-his DNA 转染到含有 Sam68 基因单体突变的细胞中, 用 50 mg/L Bsr 及 1 g/L His 筛选带有双重抗药基因的细胞克隆。

1.3 鸡 Sam68cDNA 的转染

利用脂质体转染法将载有 Sam68 cDNA 的质粒 pRchichen Sam68 puro 转染到 Bosc23 包装细胞中。再用该包装细胞所产生的病毒上清感染 PT67 细胞, 进一步用 PT67 细胞所产生的病毒产物感染 DT40 细胞, 最后用 0.5 mg/L 的嘌呤霉素 (Puro) 做药物筛选。

1.4 DNA 和 RNA 印迹分析

用 DNAzol™ 试剂 (GIBCO-BRL) 从细胞中提取基因组 DNA。取 10 μg 经 *Eco*R I 消化后的基因组 DNA, 加样到 0.8% 琼脂糖凝胶中, 电泳分离后转移至硝酸纤维素膜上; 进一步利用 ³²P 标记的长 1 kb 的 *Bam*H I - *Bgl* II 基因组 DNA 片段作为探针进行杂交检测分析。

用 TRIzol® 试剂从细胞中提取 RNA。取 10 μg RNA 加到 1% 琼脂糖凝胶中, 在含 3% 的福尔马林缓冲液中进行电泳分离; 再将 RNA 转移到硝酸纤维素膜上, 用 ³²P 标记的长 0.3 kb 的 cDNA 片段 (来源于 5' GSG 和 KH 结构域) 作为探针进行杂交检测分析。

1.5 蛋白质分析

在 4℃ 条件下将细胞溶解于 Solubilization 缓冲液中 (1% NP40, 150 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 50 U/ml Trasylol 和 1 mmol/L Na₃VO₄)。离心澄清溶解物后, 将 10 μg 的蛋白质提取液加到 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再利用半干式电泳转移, 将凝胶中的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。首先

用抗人 Sam68 的兔血清 (Santa-Cruz, San Diego, CA) 与膜上的蛋白质杂交, 再用辣根过氧化物酶标记的抗兔血清作为第二抗体进行抗原抗体反应, 利用化学发光来检测 Sam68 蛋白的表达。

1.6 免疫荧光染色和聚焦显微镜实验

将细胞悬浮于含 4% 多聚甲醛的 PBS 中固定 30 min, 继离心之后, 将细胞悬浮于 PBS 中, 1 000 r/min 离心 5 min, 将细胞固定在玻片上。用含 0.2% Triton-X100, Mg²⁺ 和 Na₃VO₄ 的 PBS 液, 室温破膜处理 10 min; 用含 5% 小牛血清的 RPMI1640 培养液封闭后再行免疫荧光染色。将细胞浸在含 5% 小牛血清, 1/200 抗人 Sam68 的兔血清及含 1 g/L RNase 的 RPMI1640 培养液中封闭 1 h, 用 PBS 清洗后, 再将细胞浸在含有 FITC 标记的 1/200 狗抗兔 IgG (Sigma 公司) 血清, 在含 1 mg/L PI 的培养液中孵育 30 min, 用 PBS 清洗 3 次后的细胞在聚焦显微镜下观察。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

将 5×10⁵ 的细胞固定于 50% 甲醇中, 放置在 4℃ 过夜。用 PBS 清洗后悬浮于磷酸氢二钠 / 枸橼酸盐 (Na₂HPO₄/Citrate) 中, 37℃ RNA 酶处理 30 min 后, 0℃ 用 PI 染色 30 min; 用 FACScan (Becton Dickinson) 对染色过滤后的细胞进行检测分析。

2 结 果

2.1 鸡 Sam68 基因的分离及其结构分析

采用基因重组技术分离 DT40 细胞的 Sam68 基因。首先合成鸡 Sam68 cDNA。因为抗人 Sam68 KH 结构域的抗体可以识别鸡的 Sam68 蛋白, 由此预测在人与鸡之间其 KH 结构域是高度保守的。对 PCR 的产物 (0.7 kb cDNA) 测序发现, 与人 Sam68 的 KH 结构域比较, 两者间核苷酸水平同源率为 86.3%, 氨基酸水平同源率为 100%。我们进一步用此 PCR 产物作为探针, 在 DT40 poly A⁺ mRNA 中行 cDNA 文库筛选, 结果分离出一段全长 2.4 kb 的鸡 Sam68 cDNA。基因测序结果表明, 与人 Sam68 基因结构比较, 总体上约 75% 核苷酸和 78% 的氨基酸序列高度保守, KH 结构域 138 个氨基酸以及 C 端结构完全一致。在两个重要功能结构域中, 酪氨酸及脯氨酸序列高度保守。然而, 与其他 Sam68 相关基因例如 *Salp*-α 和 *Salp*-β 对比, 序列同源率很低 (数据未显示)。因此认为该基因就是鸡的 Sam68 基因 (GenBank accession number AY057837), 可利用 DT40 细胞进行 Sam68 的功能

分析.

2.2 基因打靶敲除 DT40 中 Sam68 基因

根据鸡 cDNA 测序结果, 我们在其 3' 及 5' 非编码区合成了一对引物, 以 DT40 基因组 DNA 为模板扩增出一段全长 9.2 kb 的鸡 Sam68 基因组 DNA. 基因组测序结果表明不同的功能区域是由彼

此分离的外显子分别构成的.

构建打靶载体: 所构建的打靶载体分别表达抗药基因 Bsr 和 His. 用抗药基因来取代 4.1 kb 的 Sam68 基因组 DNA 片段, 该片段包括 3' KH 和 3' GSG 结构域的部分外显子 (图 1). 随着相继将打靶载体转染入 DT40 细胞中, 首先用含有药物 Bsr

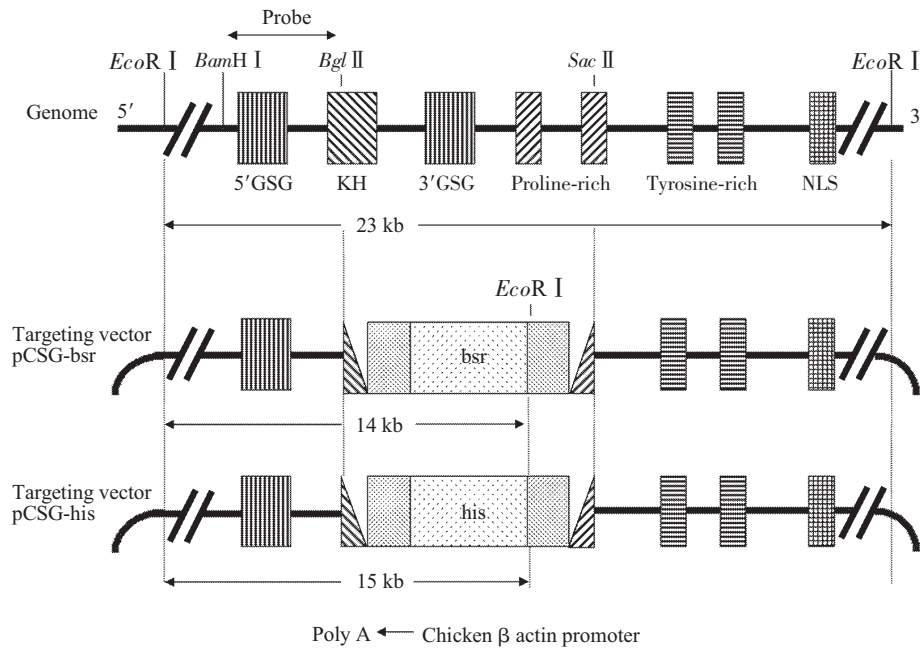


Fig.1 Disruption of the Sam68 gene in chicken DT40 cells

Structures of the chicken Sam68 gene (upper panel) and targeting vectors (middle and lower panels). Each exon contains functional motifs such as the GSG motif, KH motif, proline-rich motif, tyrosine-rich motif, and nuclear localization signal. Targeting vectors, pCSG-bsr (middle panel) and pCSG-his (lower panel), were constructed by substituting the gene fragment containing half of the KH domain and the proline-rich domain (*BamH* I to *Sac* II) with a drug-resistance gene cassette, *bsr* or *his*, respectively, that was assembled with the chicken β actin promoter and poly A⁺ signal in the pGEM-T vector.

和 His 的培养液筛选抗药基因阳性的重组细胞. 用 DNA 印迹方法确定出 5 个 Sam68 基因敲除克隆 (结果未显示), 再用来源于突变区 (5' GSG 和 KH 结构域) 的 0.3 kb cDNA 作为探针对这些克隆进行 RNA 印迹分析. RNA 印迹结果显示 (图 2): 野生型和 Sam68 单倍体基因敲除的细胞均表达 3 kb 的 mRNA, 但是, Sam68 基因完全敲除的细胞克隆不表达 Sam68 mRNA.

我们进一步用兔抗人 Sam68 的血清检测 Sam68 蛋白的表达. 实验结果证实, 5 个 Sam68 基因敲除克隆均不表达 Sam68 的蛋白 (结果未显示). 我们同时用兔抗人 Sam68 的血清及 FITC 标记的第二抗体进行原位免疫荧光染色分析 (图 3). 如图 3 所示: 可见到细胞核特异性指示染料 PI 在细胞内

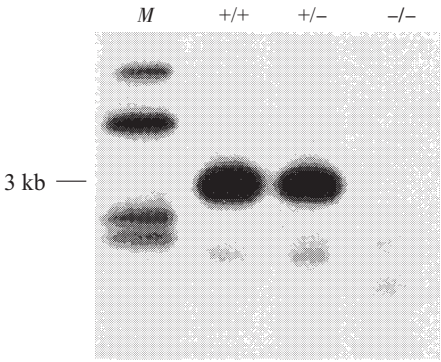


Fig.2 Northern analysis of Sam68 RNA

10 μ g aliquots of total RNAs prepared from wild type and Sam68-deficient DT40 cells were separated in a 1% agarose gel with 3% formaldehyde, blotted, and then probed with a ³²P-labeled 0.3 kb cDNA fragment covering the 5'-GSG and KH-domains. A 3 kb mRNA was expressed in wild-type DT40 cells (+/+) and mutant cells with recombination in a haploid allele (+/-), but no mRNA was detected in knocked-out cells (-/-). Lane M contains the denatured-Hind III marker DNA.

的分布, 在 Sam68 野生型细胞中可观察到细胞核中 Sam68 蛋白的绿色荧光标记, 与 PI 标记分布区

域重叠, 而在 Sam68 基因敲除细胞中未见显示 Sam68 蛋白表达的 FITC 绿色荧光.

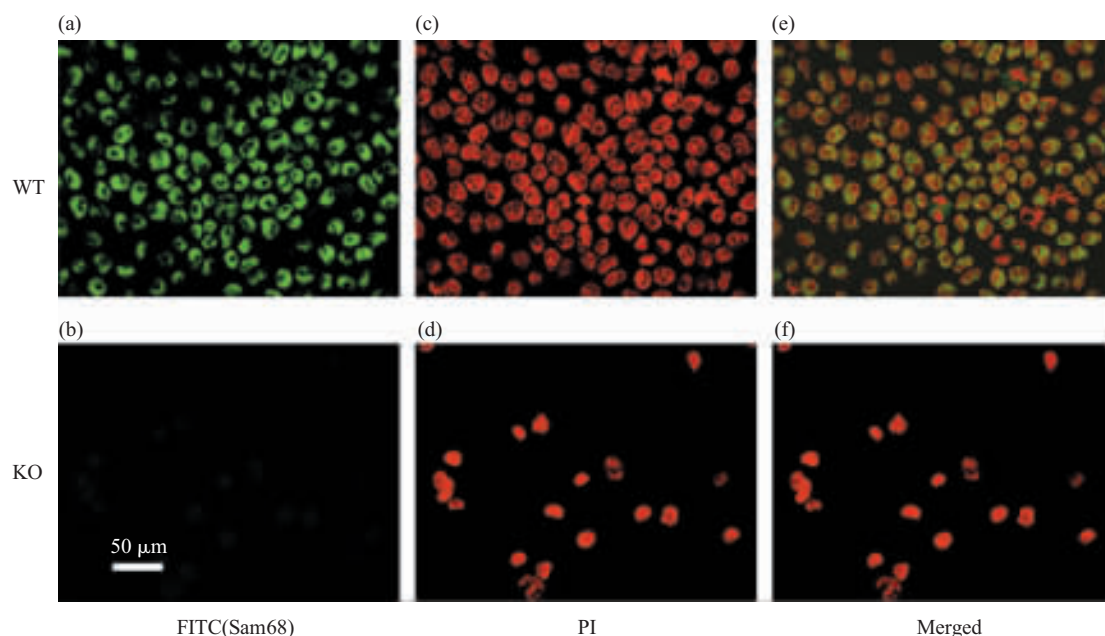


Fig.3 *In situ* immunostaining of chicken Sam68

Wild-type (a, c, e) and knocked-out (b, d, f) cells were fixed and immunostained with an anti-Sam68 antibody, followed by a FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody and PI to visualize the nucleus. Visualization of Sam68 with FITC on confocal microscope (a, b). Detection of the nucleus by PI staining (c, d). Merged images of FITC- and PI-staining (e, f). FITC-labeled Sam68 was accumulated in the nucleus in the wild type cells, but it spread to the cytoplasm during the inter-phase.

2.3 Sam68 基因缺失细胞生长延迟

用得到的 Sam68 基因缺失细胞系进行 Sam68 功能检测. 当检测野生型和 Sam68 基因缺失细胞的生长速率时发现: 在 37°C 条件下, Sam68 基因缺失细胞生长速度明显慢于野生型. 野生型细胞分裂一次仅仅需要 9.7 h, 然而突变体克隆的倍增时间约 13.9 h (图 4).

为了证实突变体细胞生长迟缓是由于 Sam68 基因缺失导致的, 我们将 Sam68 cDNA 转染到 Sam68 基因缺失的细胞克隆中, 我们称它为 Knock in Chicken Sam68 cDNA (KO+cDNA). 尽管这一克隆所表达的 Sam68 蛋白水平仅仅是野生型的一半以下 (结果未显示), 但是该细胞的生长速度却明显恢复, 倍增时间由原来的 13 h 以上缩短到 11.4 h. 由此我们得出结论: 敲除 Sam68 基因导致细胞生长迟缓.

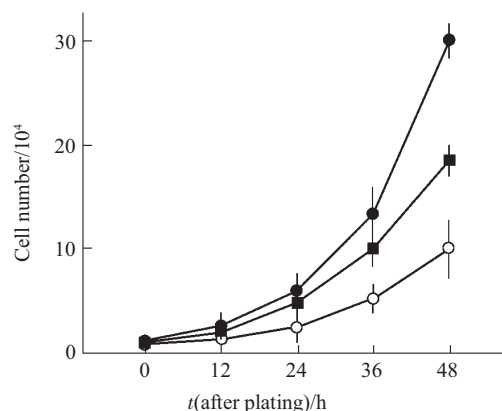


Fig.4 Growth curves for chicken Sam68-deficient cells

10^4 cells /well of the wild type, Sam68-deficient cells and the Sam68 cDNA-transduced mutant cells were plated in a 6-well culture dish, and the cell number was determined in triplicates every 12 h as described in experimental procedures. Knocked-out cells grew slower than the wild type and cDNA-transduced cells. Data represent the mean $\pm$ SEM. The doubling time shown in the inset is the average of three independent experiments. ●—●: WT $t_{1/2}$: 9.7 h; ■—■: KO+cDNA $t_{1/2}$: 11.4 h; ○—○: KO $t_{1/2}$: 13.9 h.

2.4 Sam68 基因缺失细胞 G2/M 期延长

为了进一步了解 Sam68 基因缺失对细胞周期进程的影响, 我们利用流式细胞仪进行细胞周期检测分析. Sam68 基因缺失克隆的细胞周期如图 5 所示: Sam68 基因缺失细胞的 G2/M 期占整个细胞周期的比率显著增加. 我们计算出各周期的长度(各周期长度 = 倍增时间×各周期所占的百分比)(图 6). 综合上述实验结果我们得出以下结论: Sam68 基因

缺失仅仅影响细胞周期 G2/M 期进程, 其 G2/M 期大约延长了 2 倍, 而 G0/G1 期以及 S 期均不受影响; 有意义的是重新将 Sam68 cDNA 表达到 Sam68 基因缺失细胞系时该细胞系 G2/M 期进程有所加快. 此结果揭示了突变体细胞生长速率延迟的缘故. 综上所述, 我们的实验结果揭示: Sam68 生物学功能是通过影响细胞周期的 G2/M 期进程来调控细胞生长.

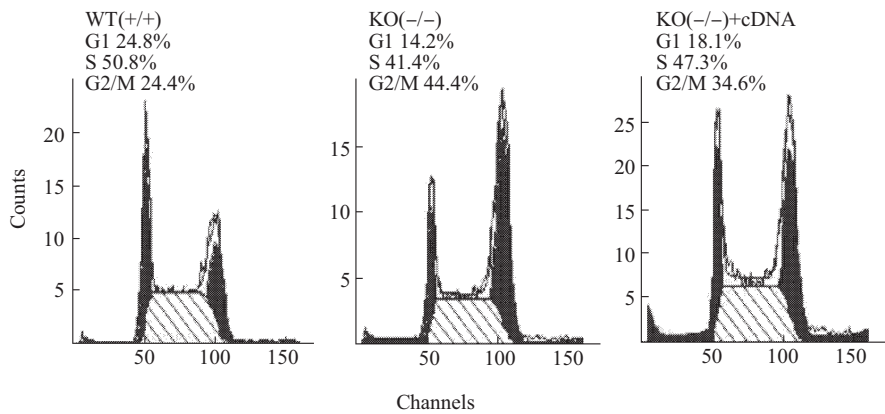


Fig.5 Flow-cytometric analysis of Sam68-deficient DT40 cells

5×10⁵ cells were fixed and stained with a PI (Sigma) solution as described in experimental procedures. Filtered samples were subjected to analysis with a FACScan. The cell population in each phase of the cell cycle was indicated. Sam68 knocked-out cells (-/-) showed an increased G2/M phase compared to wild type (+/+) and cDNA transformed knocked-out (-/-) + cDNA cells.

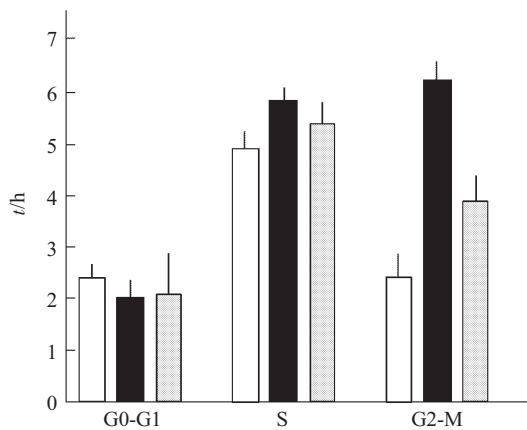


Fig.6 Phase lengths of the cell cycle in Sam68-deficient DT40 cells

The length of each phase in the cell cycle was determined by multiplying the doubling time by the percentage of each phase in wild type, knocked-out, and cDNA-transformed knocked-out cells. □: WT; ■: KO; ▨: KO+cDNA.

2.5 Sam68 蛋白质缺失细胞中周期因子的表达以及 Cdc2 激酶的活性检测

许多细胞周期因子参与细胞周期进程的调控, 为了明确 Sam68 与其他能够影响细胞周期 G2/M 期进程因子的关系, 我们检测了 Sam68 基因缺失细胞中 Cyclin B 和 Cyclin A mRNA 以及 Cyclin D 的表达水平, 结果显示野生型和突变体细胞 Cyclin A, Cyclin B 以及 Cyclin D 的表达水平无差别 (结果未显示). Cyclin B/Cdc2 复合物的活性是趋动物细胞周期 G2/M 期进程的主要因素, 我们进一步检测了 Cdc2 激酶活性, 图 7 所示野生型和突变体细胞表达同等水平的 Cdc2 激酶活性.

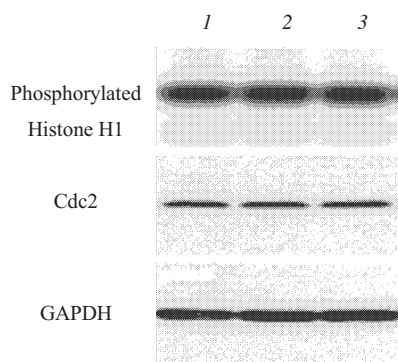


Fig.7 Analysis of Cdc2 kinase activity

Upper panel: Cdc2 kinase activity (monitored by phosphorylation of histone H1). 25 μ g of protein from each cell line were immuno-precipitated with 1 μ g Cdc2 antibody and the immuno-precipitates were incubated in the kinase buffer containing 0.5 g/L H1 histone, 1 μ mol/L ATP, and 18.5×10^{10} Bq [γ - 32 P] ATP as substrate. After incubation at 30°C for 5 min, the reaction mixtures were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel and autoradiographed for 12 h. 1: wild type cell; 2: Sam68 knocked-out clone; 3: Sam68 knocked-out clone transformed with chicken Sam68 cDNA. Middle panel: Expression of Cdc2. 10 μ g of each protein was separated by 12% SDS-PAGE and Cdc2 was detected with anti-Cdc2 antibody. Lower panel: GAPDH expression on the same blot as middle panel was monitored as a control.

3 讨 论

Sam68 的功能作用已愈来愈被人们所关注. 有报道在细胞有丝分裂期, Src- 酪氨酸激酶抑制剂根赤壳菌素 (radicicol) 可以阻断 Sam68 被酪氨酸磷酸化, 并引起细胞周期 M 期延长^[9]. 而且只有在细胞有丝分裂期, Sam68 可能被与 Src 相关的一些酪氨酸激酶磷酸化, 当其被磷酸化后, Sam68 结合 RNA 的能力受到明显的削弱^[17]. 还有报道, 在细胞有丝分裂期, Sam68 丝氨酸残基被 Cdc2 磷酸化^[20]. Sam68 还被证明可增强 Rev 介导的非剪切的 HIV-1 mRNA 的核输出^[21], 而且这种活性受 Cdc2 激酶抑制剂 lomoucine 的抑制^[22]. 上述报道都强有力地证明了 Sam68 的功能是参与细胞周期中有丝分裂的调控, 也进一步解释了我们的实验结果即 Sam68 基因缺失导致细胞 G2/M 期延长.

本实验中敲除 Sam68 基因导致细胞生长缓慢、细胞周期 G2/M 期进程延长. 将外源 Sam68 基因转染到这一细胞系, 可通过缩短 G2/M 期进程来缓解细胞生长的延迟. 然而, Barlat 等^[18]也曾报道, KH 结构域部分丧失的 Sam68 野生型自然剪切体, 会抑制血清刺激细胞进入 S 期, 我们尚不清楚这两个实验结果差异的原因. 但我们推测: 由于缺失 RNA 结合区产生突变的 Sam68 可能是以结合区阴性的形式与信号传导分子结合, 抑制信号传

导从而失去了控制 RNA 代谢的作用. 因此, Sam68 基因缺失对细胞周期的调控, 可能与过度表达部分丧失的 KH 结构域而形成的自然剪切体不同.

参照 Wang 等^[23]的研究结果: 在结肠直肠肿瘤细胞系中, 由于 RNA 结合蛋白 HuR 的缺失导致了细胞生长的延迟, 抑制 HuR 的表达导致编码 Cyclin A 和 Cyclin B 的 mRNA 不稳定, 由此降低了 Cyclin/Cdc2 激酶活性, 这是细胞生长延缓, 细胞周期 (尤其是 G2/M 期) 进程延长的根本原因. 分析我们的实验结果, Sam68 缺失导致了同样的结果即细胞生长延缓以及 G2/M 期的延长, 但该细胞编码 Cyclin A 和 Cyclin B 的 mRNA 以及 Cdc2 酶的活性却无变化, 我们推论: 可能并不是 Cyclin B/Cdc2 与 Sam68 基因共同操纵调控细胞的生长, 而是由尚不清楚的因素操纵调控此过程. 从这个角度分析, Hill 等^[24]曾报道: 在血清的刺激下, 当观察细胞动力运动时发现 Sam68 与 β -actin mRNA 共同定位于细胞的边缘. 而 β -actin 的功能涉及到细胞分裂、运动以及细胞内信号传递, 因此我们推论: 在细胞周期的 G2/M 期进程中, Sam68 可能通过与 β -actin 或者某个目前尚不清楚的因子共同参与调控细胞周期进程.

为了进一步清楚 G2/M 期延迟的机理, 我们下一步的目标是确认一系列 Sam68 靶 RNA 分子, 利用这些靶分子的功能信息有望进一步阐明 Sam68 是如何调控 RNA 代谢以及参与细胞周期调节从而影响细胞生长的.

参 考 文 献

- 1 Vernet C, Artzt K. STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *Trends Genet*, 1997, **13**(12): 479-484
- 2 Zorn A M, Grow M, Patterson K D, *et al.* Remarkable sequence conservation of transcripts encoding amphibian and mammalian homologues of quaking, a KH domain RNA-binding protein. *Gene*, 1997, **188** (2): 199-206
- 3 Wong G, Muller O, Clark R, *et al.* Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62. *Cell*, 1992, **69** (3): 551-558
- 4 Lin Q, Taylor S J, Shalloway D. Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J Biol Chem*, 1997, **272** (43): 27274-27280
- 5 Chen T, Damaj B B, Herrera C, *et al.* Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (10): 5707-5718
- 6 Chen T, Richard S. Structure-function analysis of Qk1: a lethal point mutation in mouse quaking prevents homodimerization. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (8): 4863-4871

- 7 Zorn A M, Krieg P A. The KH domain protein encoded by quaking functions as a dimer and is essential for notochord development in *Xenopus embryos*. *Genes Dev*, 1997, **11** (17): 2176~2190
- 8 Siomi H, Choi M, Siomi M C, *et al.* Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell*, 1994, **77** (1): 33~39
- 9 Taylor S J, Shalloway D. An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*, 1994, **368** (6474): 867~871
- 10 Fumagalli S, Totty N F, Hsuan J J, *et al.* A target for Src in mitosis. *Nature*, 1994, **368** (6474): 871~874
- 11 Fusaki N, Iwamatsu A, Iwashima M, *et al.* Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem*, 1997, **272** (10): 6214~6219
- 12 Richard S, Yu D, Blumer K J, *et al.* Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (1): 186~197
- 13 Maa M C, Leu T H, Trandel B J, *et al.* A protein that is highly related to GTPase-activating protein-associated p62 complexes with phospholipase C gamma. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (8): 5466~5473
- 14 Sanchez-Margalet V, Najib S. p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. *FEBS Lett*, 1999, **455** (3): 307~310
- 15 Lawe D C, Hahn C, Wong A J. The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68. *Oncogene*, 1997, **14** (2): 223~231
- 16 Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell Immunol*, 2001, **211** (1): 30~36
- 17 Wang L L, Richard S, Shaw A S. p62 association with RNA is regulated by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 1995, **270** (5): 2010~2013
- 18 Barlat I, Maurier F, Duchesne M, *et al.* A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J Biol Chem*, 1997, **272** (6): 3129~3132
- 19 Pillay I, Nakano H, Sharma S V. Radicol inhibits tyrosine phosphorylation of the mitotic Src substrate Sam68 and retards subsequent exit from mitosis of Src-transformed cells. *Cell Growth Differ*, 1996, **7** (11): 1487~1499
- 20 Resnick R J, Taylor S J, Lin Q, *et al.* Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis. *Oncogene*, 1997, **15** (11): 1247~1253
- 21 Reddy T R, Xu W, Mau J K, *et al.* Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med*, 1999, **5** (6): 635~642
- 22 Reddy T R, Tang H, Xu W, *et al.* Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. *Oncogene*, 2000, **19** (32): 3570~3575
- 23 Wang W, Caldwell M C, Lin S, *et al.* HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J*, 2000, **19** (10): 2340~2350
- 24 Hill M A, Schedlich L, Gunning P. Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell. *J Cell Biol*, 1994, **126** (5): 1221~1229

Knock Out of Sam68 Induces Retardation of the G2-M Phase Progression and Decreased Growth in Leukemia Cell Line*

LI Qing-Hua, PANG Tian-Xiang**, HAN Zhong-Chao

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology,

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Sam68, a nuclear RNA binding protein, is the Src mitotic target and specifically tyrosine phosphorylated during mitosis. It has also been demonstrated to associate with various signal transduction molecules, thereby raising the possibility of its role in cell cycle control as a modulator of the signal transduction and activation of RNA metabolism. To elucidate the physiological function, a Sam68-deficient cell line was isolated from the chicken DT40 cell line by gene disruption. The Sam68 deficient cells exhibited markedly decreased growth, and forced expression of chicken Sam68 cDNA in the mutant cells restored the cell growth. Cell cycle analysis revealed that the growth retardation was due to elongation of the G2-M phase, however, the kinase activity associated with Cdc2 remained unaltered. The results indicate that Sam68 may play a critical role in G2-M progression in a manner independent of the control of cyclin/Cdc2 kinase activity.

Key words Sam68, RNA binding protein, gene targeting, cell cycle

*This work was supported by grants from The Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Tianjin City (05YFJMJ02400).

**Corresponding author . Tel: 86-22-27307938-3112, Fax: 86-22-27306542, E-mail: tianxiangpang@yahoo.com.cn

Received: January 13, 2005 Accepted: April 26, 2005