

研究论文

盘基网柄菌发育期间gp150蛋白与蛋白激酶A相关性的研究

田莉 陈颖盈 梁静静 侯连生*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 盘基网柄菌进入多细胞发育阶段后, 野生型KAX-3细胞的盘基网柄菌蛋白激酶A(DdPKA)活性分别在12, 16, 20 h时显著升高, 这一变化趋势与细胞形态学上的分化有关; 而突变型AK127细胞(gp150蛋白缺失)的DdPKA活性则一直保持在较高水平, 直至22 h才缓慢下降。两种细胞类型中24 h的DdPKA活性都再一次升高。总体而言, AK127细胞的DdPKA活性要比KAX-3细胞高。这表明AK127细胞可能因缺失了gp150蛋白而导致DdPKA活性调控失去控制。在KAX-3细胞的分化过程中, 前柄细胞(*prestalk cells*, *pst*) DdPKA的活性在16~18 h缓慢上升, 但在20 h时显著下降; 前孢子细胞(*prespore cells*, *psp*)中DdPKA的活性在18 h时显著下降, 但在20 h时又迅速恢复, 并达到前柄细胞中DdPKA活性的两倍。激光共聚焦结果显示, 在KAX-3发育的关键阶段, DdPKA两种亚基的胞内定位并不一致, DdPKA-R亚基在空间位置上更为靠近gp150蛋白, 甚至互相重叠。以上结果表明, gp150蛋白可能通过影响DdPKA-R的活性来调控前柄细胞的凋亡和前孢子细胞的分化。

关键词 盘基网柄菌蛋白激酶A; 黏附分子gp150; 蛋白间相互作用

“社会变形虫”盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)隶属原生生物, 以细菌为食。在营养丰富的条件下, 盘基网柄菌以二分裂的方式繁殖生长; 而食物耗尽时, 又可进入多细胞发育阶段^[1-2], 其发育过程类似多细胞胚胎的发育^[3]。因此, 盘基网柄菌是一种可以用来研究细胞的趋化性运动、胞间信号转导、细胞类型分化和发育调控等的新型模式动物。

盘基网柄菌细胞表面存在多种黏附分子^[4], 其中gp150蛋白对多细胞发育和细胞分化最为不可或缺^[5-6]。由*lagC*基因编码的gp150蛋白分子量约为97 kDa, 但被高度糖基化后, SDS-PAGE电泳结果为150 kDa。gp150蛋白为异嗜性表面黏附分子, 如果缺失, 对细胞结构和生理过程均有较大影响^[7], 并且盘基网柄菌不能完成多细胞发育。gp150蛋白与细胞丘外层膜物质的形成以及前柄细胞(*prestalk cells*, *pst*)的分化有密切关系^[5,8]。黏附分子既能黏连细胞, 又能传递细胞间或细胞外的信号。但是到目前为止, 关于gp150蛋白与胞内相关信号分子关系的报道却不多见。

蛋白激酶A(PKA)由同源四聚体组成, 存在于所有动物细胞内, 是许多胞内信号通路的耦联蛋白。过去十多年的研究发现, 盘基网柄菌PKA(DdPKA)是

由一个催化亚基(PKA-C)和一个调节亚基(PKA-R)组成的异源二聚体^[9], 也参与细胞分化及细胞形态的发育^[10-11]。敲除*DdpkaC*或是过表达*DdpkaR*的突变细胞都将阻断细胞的形态发育^[12-13]。那么, gp150分子在完成形态学上发育的同时, 是否还影响到其他信号通路呢? 特别是gp150与DdPKA的相互作用, 目前国内外均未见报道, 因此有必要进行深入研究。本文使用反相离子对高效液相色谱法检测多细胞发育过程中盘基网柄菌野生型细胞(KAX-3)、gp150蛋白突变型细胞(AK127)中, 及KAX-3细胞分化过程中前柄细胞(*prestalk cells*, *pst*)和前孢子细胞(*prespore cells*, *psp*)的DdPKA活性, 初步证实DdPKA与gp150蛋白存在一定关系。为进一步研究二者关系, 本文又通过激光共聚焦技术开展KAX-3细胞发育关键阶段gp150蛋白和DdPKA各亚基的共定位, 发现DdPKA-R亚基在空间位置上更为靠近gp150蛋白, 为研究gp150蛋白的信号通路提供了有用的资料。

收稿日期: 2012-03-21 接受日期: 2012-04-18

国家自然科学基金(No.30970316, No.30670266)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 细胞株和细胞培养

KAx-3细胞由多伦多大学医学院Dr. Siu惠赠。AK127细胞来源于KAx-3细胞, 是通过限制性酶切介导的整合技术(REMI)剔除*lagC*基因后得到的突变型细胞。细胞培养在SM琼脂培养基上, 用*Klebsiella aerogenes*喂养。在对数期用磷酸缓冲液(pH6.4)洗净细菌并收集细胞, 制成 2×10^8 /mL的细胞悬液, 铺于2%琼脂板上发育。发育10 h后每隔2 h收集细胞, 并制成 2×10^8 /mL的细胞悬液。

1.2 前柄细胞和前孢子细胞的收集

参照Ratner等^[14]的方法, 用Percoll密度梯度分离技术分别获得发育至16, 18, 20 h的前柄细胞和前孢子细胞。

1.3 DdPKA的制备

向各样品中加入DdPKA提取液500 μ L, 冰浴研磨粉碎细胞。900 \times g离心5 min, 去除碎片和细胞核, 得到的上清为胞浆组份和膜性组份, 用于测定DdPKA的总活力^[15]。

1.4 DdPKA活性检测

主要参照李明春等^[15]用RP-HPLC测定细胞中蛋白激酶活性的方法测定盘基网柄菌细胞内的DdPKA活性, 并对检测条件进行了适当改进。

1.4.1 DdPKA反应体系 包括DdPKA反应液^[15]和含0.15 mg蛋白量的酶液, 反应总体积为1 mL。

1.4.2 DdPKA酶促反应 先将除酶液以外的其他溶液混匀, 30 $^{\circ}$ C预热5 min, 再加入酶液起始反应。反应开始后于30 $^{\circ}$ C水浴摇床中准确保温10 min, 立即置于沸水浴中1 min终止反应。冷却后离心除去蛋白沉淀, 上清液中加入1 mL氯仿:甲醇(2:1, V/V)混合物, 振荡1 min, 抽提脂溶性物质, 2 000 \times g离心5 min; 小心吸出水层, 其中含ATP、ADP和AMP。

1.4.3 DdPKA活性测定 色谱条件: μ Rondopka C18柱; 流动相: 0.04 mol/L甲醇:磷酸氢二钾缓冲液(14:86, V/V, 内含5 mmol/L PiCA, pH7.0); 检测波长为259 nm; 柱温: 室温; 进样20 μ L。

1.4.4 酶活单位定义 一个酶活力单位(U)相当于每分钟使组蛋白Histone(III-S)磷酸化而消耗1 nmol ATP所需的酶量。

1.5 免疫荧光染色

主要参照侯连生等^[8]盘基网柄菌柄细胞分化过程中相关蛋白双免疫荧光染色的方法, 并进行了改

进。

1.5.1 盘基网柄菌的盖玻片发育 取500 μ L浓度为 2×10^6 /mL的KAx-3对数期细胞铺于多聚赖氨酸处理后的盖玻片上, 22 $^{\circ}$ C恒温湿盒中发育。

1.5.2 双标免疫荧光染色 盖玻片上的KAx-3细胞发育至16 h; 室温下, 用3.7%甲醛固定细胞15 min, 再用预冷的含1%甲醛的甲醇透膜5 min, 然后依次用兔抗gp150血清(1:200稀释)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanat, FITC)标记的山羊抗兔荧光二抗(1:300稀释)进行第一次免疫染色, 用含0.05% Tween-20的PBS溶液淋洗盖玻片3次; 每张盖玻片加封阻液(含1% BSA和0.1% Tween-20的PBS溶液)500 μ L封阻细胞约20 min; 再依次用兔抗PKA-C亚基一抗(1:200稀释)或兔抗PKA-R亚基一抗(1:200稀释)、四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)标记的山羊抗兔荧光二抗(1:300稀释)进行第二次细胞免疫染色; 封片保存。

1.5.3 激光共聚焦显微镜观察 激光共聚焦显微镜Leica TCS SP2观察免疫荧光染色结果, 16 \times 和63 \times 物镜, 拍照保存。

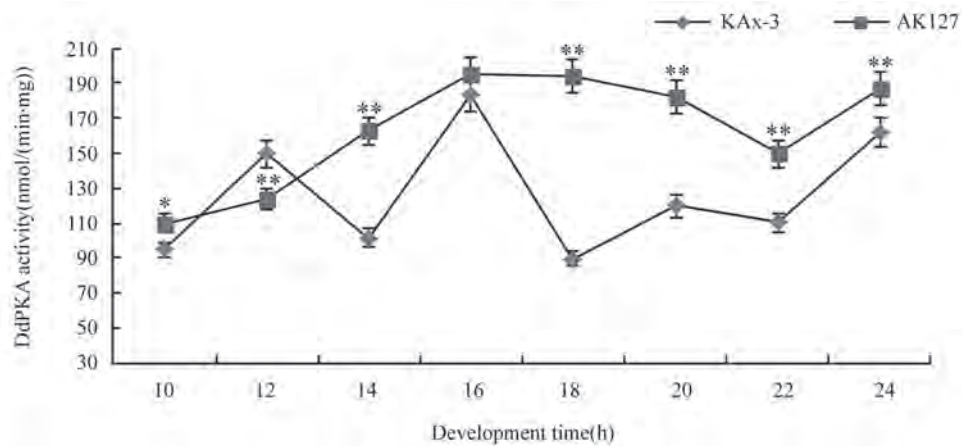
2 结果

2.1 多细胞发育后期各阶段DdPKA活性的差异

KAx-3细胞发育至10 h时DdPKA的活性仅为94.54 U, 至12 h时达到149.44 U, 14 h时下降了近50 U; 16 h时DdPKA的活性最高, 达到183.54 U, 随即又下降了一半; 至18 h时其活性只有89.57 U。在KAx-3细胞发育的后期, DdPKA的活性又经历了一次小高峰: 在20 h时达到119.59 U, 22 h时又下降了近10%(图1); 在发育末期(24 h), DdPKA的活性又升高到162.10 U(图1)。

AK127细胞的DdPKA活性与KAx-3细胞相比有明显差异(图1)。发育的10~16 h, DdPKA的活性呈上升趋势, 酶活依次为: 109.79 U(10 h)、123.97 U(12 h)、162.52 U(14 h)和194.75 U(16 h), 增加了约77%; 发育到18 h时, 酶活性开始下降, 到20 h时为182.31 U, 到22 h时仅为149.72 U。但24 h时细胞中DdPKA的活性再次升高, 达到187.24 U(图1)。

用SPSS 18.0软件对两种细胞进行差异显著性分析, 结果表明, 总体上AK127细胞的DdPKA活性极显著高于KAx-3细胞($P < 0.01$), 但12 h时较为特殊, KAx-3细胞的活性极显著高于AK127细胞($P < 0.01$)。



以上数据通过3次平行实验获得, 每次实验每组设立3个平行组, 即为9次测量结果的均值。KAx-3细胞和AK127细胞各时间点的测量误差均小于10%。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与相同时间点KAx-3菌株DdPKA活性相比较。纵坐标为DdPKA的酶活性(U), 单位是nmol/(min·mg)。

Each experimental datum was obtained through 3 parallel experiments and there were 3 parallel groups in every parallel experiment, so the data above were the mean value of 9 measuring results. The measurement error of KAx-3 cells and AK127 cells was less than 10%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the DdPKA activities of KAx-3 at the same time-point. The ordinate is enzymatic activity (U) of DdPKA whose unit is nmol/(min·mg).

图1 野生型细胞(KAx-3)和突变型细胞(AK127)发育10~24 h的DdPKA活性

Fig.1 DdPKA activity in the wild type(KAx-3) and *lagC*⁻ mutant(AK127) cells from 10~24 h during *Dictyostelium discoideum* development

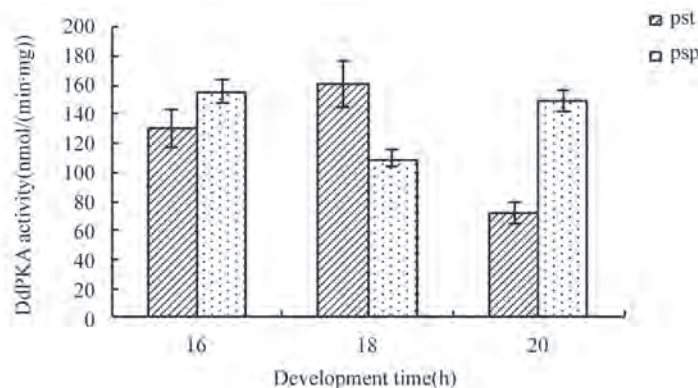
2.2 前柄细胞和前孢子细胞中DdPKA的活性差异

在KAx-3细胞早期蛞蝓体阶段, 约20%为前柄细胞, 其余80%为前孢子细胞。DdPKA活性在前柄细胞和前孢子细胞中存在差异(图2)。发育到16, 18, 20 h时, 前柄细胞的DdPKA活性依次为130.53, 161.48, 72.10 U, 前孢子细胞的DdPKA活性则分别为: 155.79, 09.65, 149.83 U。16 h时, 前孢子细胞的DdPKA活性显著高于前柄细胞; 18 h时前柄细胞的DdPKA活性上升, 而前孢子细胞中酶活性下降, 该阶段前柄细胞的酶活

性比前孢子细胞高出约50 U; 但是20 h时, 前柄细胞的酶活性迅速降低, 前孢子细胞的酶活性得到恢复, 是前柄细胞的两倍。

2.3 gp150蛋白和DdPKA各亚基的胞内共定位

由于抗gp150和抗DdPKA各亚基的抗体均为兔源抗体, 对同一多细胞聚集体进行双标免疫染色时, 分别用FITC和TRITC标记的二抗进行孵育。为了避免荧光二抗错误地标记一抗的位置, 本实验设计在两组抗体进行免疫染色过程中, 多进行一次非特异



以上数据通过3次平行实验获得。每次实验每组设立3组平行, 即为9次测量结果的均值。前柄细胞和前孢子细胞的测量误差均小于10%。

Each experimental datum was obtained through 3 parallel experiments and there were 3 parallel groups in every parallel experiment, so the data above were mean value by 9 measuring results. The measurement error of prestalk cells and prespore cells was less than 10%.

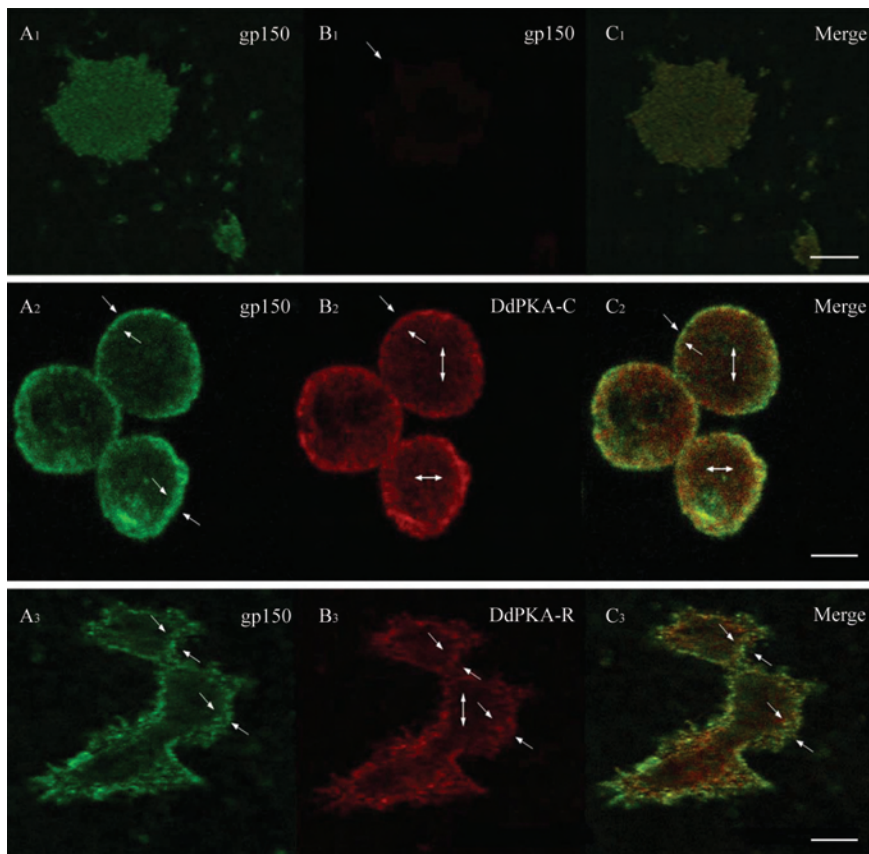
图2 KAx-3细胞发育至16~20 h期间前柄细胞(pst)和前孢子细胞(psp)的DdPKA活性比较

Fig.2 DdPKA activity in prestalk cells(pst) and prespore cells(psp) during KAx-3 development at 16~20 h

性表位的封阻。结果显示,单通道下可以看到明显的绿色荧光和很微弱的红色荧光(图3B₁,箭头所示);双通道合成图像后,多细胞体仍呈现绿色荧光,表明该封阻步骤有效避免了标记DdPKA各亚基的红色荧光抗体对gp150抗体可能的错误标记。

黏附分子gp150与DdPKA两种亚基的共定位结果显示:发育16 h时的gp150蛋白主要缔合在聚集体外周的数层细胞中,呈颗粒状(图3A₂和图3A₃,箭头所示);DdPKA-C亚基几乎散布在聚集体的各个部分,不但在外周细胞层有大量分布(图3B₂,单箭头所示),

内部细胞中也有大量分布(图3B₂,双箭头所示);DdPKA-R亚基主要分布在多细胞体外缘细胞中,并且也聚集成颗粒状(图3B₃,单箭头所示),内部细胞中只有少量分布(图3B₃,双箭头所示);gp150蛋白和DdPKA各亚基共定位结果显示,DdPKA-R亚基的各颗粒与gp150蛋白各颗粒基本重叠(图3C₃,单箭头所示),而DdPKA-C亚基与gp150蛋白则是在颜色上显示有重叠(图3C₂,单箭头所示),但在聚集体内部大部分部位只显示DdPKA-C亚基的红色荧光,表明DdPKA-C亚基与gp150蛋白基本没有重叠(图3C₂,双箭头所示)。



A₁-C₁: 发育至12 h的多细胞体; A₁: gp150蛋白被FITC标记为绿色荧光; B₁: 二次封阻后, gp150不能被TRITC染色, 仅见很微弱的红色荧光(单箭头所示); C₁: 双通道图像合成后, 多细胞体仍显绿色荧光。标尺=40 μm。A₂-C₂: 发育至16 h的多细胞体; A₂: gp150蛋白被FITC标记, 边缘处可见明显的绿色荧光颗粒(单箭头所示); B₂: DdPKA-C亚基被TRITC标记, 外缘处可见红色荧光(单箭头所示), 细胞内部也可见红色荧光(双箭头所示); C₂: 双通道图像合成后, DdPKA-C亚基与gp150蛋白在聚集体外缘颜色上显示有重叠(单箭头所示), 内部基本没有重叠(双箭头所示)。标尺=10 μm。A₃-C₃: 发育至16 h的多细胞体; A₃: gp150蛋白被FITC标记, 边缘处可见明显的绿色荧光颗粒(单箭头所示); B₃: DdPKA-R亚基被TRITC标记, 边缘处可见明显的红色荧光颗粒(单箭头所示), 内部只见微弱的红色荧光(双箭头所示); C₃: 双通道图像合成后, DdPKA-R亚基的各颗粒与gp150蛋白各颗粒基本重叠(单箭头所示)。标尺=10 μm。

A₁-C₁: 12 h later; A₁: gp150 was marked as green fluorescence by FITC; B₁: gp150 was not dyed by TRITC after blocking again and only faint red fluorescence could be found (single arrow); C₁: only green fluorescence could be found after merge. Scale bar=40 μm. A₂-C₂: 16 h later; A₂: gp150 was marked as green fluorescence granule in the outer cells (single arrows); B₂: DdPKA-C was dyed to red in outer cells (single arrows) and also in the inner cells (double arrow) by TRITC after blocking again; C₂: DdPKA-C and gp150 could overlap on color in the outer cells (single arrows) and not in the inner cells (double arrow) after merge. Scale bar=10 μm. A₃-C₃: 16 h later; A₃: gp150 was marked as green fluorescence granule in the outer cells (between single arrows); B₃: DdPKA-R was dyed to red fluorescence granule in outer cells (single arrows) by TRITC after blocking again, but only faint red in the inner cells (double arrow); C₃: fluorescence granules of both DdPKA-R and gp150 could be spatially overlapped (single arrows) after merge. Scale bar=10 μm.

图3 KAx-3细胞的双标免疫荧光染色

Fig.3 Double-immunofluorescent staining in KAx-3 cells

3 讨论

KAx-3细胞发育10 h后, 可检测到黏附分子gp150的表达^[8]。DdPKA活性在KAx-3细胞发育的各时期表现出的差异与细胞分化的调控时间有紧密联系。发育的12, 16, 20 h这三个时间点的DdPKA活性有极显著升高, 而这三个时间点也是细胞形态发生变化的关键时期: 多细胞发育分别进入细胞丘、蛞蝓体和拔顶阶段的起始期。腺苷酸环化酶A(ACA)在细胞突起(进入蛞蝓体阶段)中活性较高, 但是在成熟蛞蝓体中活性发生下调^[12], ACA的活性变化与DdPKA的活性变化是密切相关的, 这与16 h时的实验结果(DdPKA活力显著上升、18 h快速下降)也是一致的。进入发育后期(20 h), 分化细胞的分布位置发生变化, 原本位于蛞蝓体后端的前孢子细胞开始挪到前柄细胞的前方, 而前柄细胞后撤开始形成稳固的基盘和起到支撑作用的柄细胞。DdPKA主要协助细胞分化, 因此在20 h时酶活性显著上升。发育至24 h的KAx-3细胞已形成子实体, 此时胞内已没有gp150蛋白, 但其DdPKA活性与AK127细胞一样处于较高水平, 这是因为孢子形成包囊的过程需要DdPKA的参与^[16]。AK127细胞在发育12 h后, 一直处于聚集、解聚和重建细胞丘的过程中^[17], 因不能分化形成孢子和柄细胞而无法完成多细胞发育。与KAx-3细胞相比, AK127的DdPKA活性整体水平显著升高, 提示gp150蛋白缺失可导致AK127细胞DdPKA活性失去控制。有研究发现, gp150蛋白缺失能造成组氨酸激酶(DhkA)的过表达, DhkA可抑制磷酸二酯酶RegA的活性, 进而提高胞内cAMP的表达量, 从而激活DdPKA^[18]。本实验室之前也有过相似报道^[19-20]。

发育的第12 h是两种细胞中DdPKA活性差别较为特殊的时期, 该阶段KAx-3细胞的DdPKA活性比AK127细胞高, 这可能因为发育的第12 h是细胞能否进入紧密聚集体的关键时刻。KAx-3细胞由于gp150蛋白的存在, 可建立起稳定的胞间连接, 这种胞膜间的紧密连接瞬间刺激了相关酶的活性, 特别是细胞膜上的腺苷酸环化酶, 结果DdPKA活性出现了上升; 而AK127细胞缺乏gp150蛋白, 胞间联系不稳定, 所以这个时刻DdPKA并不十分活跃。盘基网柄菌细胞内还存在一个DdPKA负调节子*rdeA*, 在*rdeA*突变细胞中cAMP的表达量发生上调^[21], 从而影响DdPKA的活性。因此, 需要进一步研究cAMP

的表达情况, 才能阐明造成发育12 h时两种细胞DdPKA活性存在差别的原因。

DdPKA活性与gp150蛋白空间分布也存在一定关系。在多细胞发育过程中, gp150蛋白在前柄细胞区逐渐增加, 但在前孢子区基本没有分布^[8], gp150蛋白可能与前柄细胞的分化有着密切的关系^[2,8,22]。免疫荧光染色的实验结果显示, gp150蛋白主要定位于多细胞体的边缘部位, 进一步证实了此蛋白与柄细胞分化的关系。盘基网柄菌细胞的分化涉及许多因子^[23], 其终极分化则是由DdPKA触发的^[21]。激光共聚焦定位结果表明, gp150分子和DdPKA各亚基在多细胞聚集体边缘部位均有分布, 并发生重叠。DdPKA-R主要分布于多细胞体边缘部位, 与gp150蛋白重叠现象很明显; 而DdPKA-C在聚集体内部也有大量分布, 因此推测gp150蛋白与DdPKA-R亚基关系更为密切。王大磊等^[24]发现与gp150分子相互作用的蛋白与细胞分化密切相关, gp150蛋白又对柄细胞的形成至关重要, 进而有可能通过gp150蛋白与DdPKA-R亚基的相互作用来影响DdPKA-C的活性, 三者共同调控盘基网柄菌柄细胞分化, 具体调控机制有待于进一步研究。

DdPKA活性在KAx-3的前柄细胞和前孢子细胞发育过程中存在显著差异。发育18 h的前柄细胞中DdPKA活性上升, 但在20 h时明显下降。有研究指出, 激活的PKA能抑制caspase活性和细胞色素C的释放, 从而抑制细胞凋亡^[25], 并且发现只有在前柄细胞中才能检测到caspase 3的表达^[26], 前柄细胞最终会凋亡成空泡化的柄细胞^[27]。gp150蛋白与柄细胞分化有密切关系^[8], 发育20 h的前柄细胞内DdPKA活性降低是因为细胞将由caspase 3介导凋亡, 完成柄细胞的空泡化, 因此推测DdPKA活性降低也很可能与gp150蛋白的调节有一定关系。RP-HPLC技术检测到前孢子细胞DdPKA活性在18 h降低后在20 h时又迅速上升, 此现象与孢子细胞的分化过程相吻合。显著升高的DdPKA活性可通过抑制caspase 3的活性, 促进孢子细胞的成熟。AK127细胞内DdPKA活性由于缺乏gp150蛋白的调控始终维持在较高水平, 其之所以不能完成多细胞发育, 也有可能是因为caspase 3的活性被抑制, 从而导致其前柄细胞和前孢子细胞的相关发育基因无法正常表达。

综上所述, 我们初步证实了gp150蛋白缺失可导致DdPKA活力因失控而上升, 并推测gp150蛋白

很有可能通过与DdPKA-R亚基相互作用来影响胞内DdPKA的活性, 最终调控细胞发育与分化, 但其更为具体的作用机制有待进一步探究。

参考文献 (References)

- 1 彭建涛, 施佳乐, 谭 宁, 侯连生. 盘基网柄菌中分化诱导因子信号与细胞命运决定. 细胞生物学杂志(Peng Jiantao, Shi Jiale, Tan Ning, Hou Liansheng. DIF signaling pathways and cell-fate determination in *Dictyostelium discoideum*. Chinese Journal of Cell Biology) 2006; 28(2): 183-7.
- 2 孙进楚, 侯连生. 盘基网柄菌细胞发育过程中尿囊酸酶的亚细胞定位. 中国细胞生物学报(Sun Jinchu, Hou Liansheng. Subcellular localization of allantoinase in *Dictyostelium discoideum* cells during differentiation and apoptosis. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(8): 880-5.
- 3 付卓敏, 侯连生. 盘基网柄菌细胞的分化及其调控. 细胞生物学杂志(Fu Zhuomin, Hou Liansheng. Cell differentiation and regulation of *Dictyostelium discoideum*. Chinese Journal of Cell Biology) 2002; 24(5): 289-93.
- 4 侯连生, 朱红英, 袁朝辉, 张兰新. 盘基网柄菌细胞的黏附分子. 生命的化学(Hou Liansheng, Zhu Hongying, Yuan Chaohui, Zhang Lanxin. Adhesion molecules of *Dictyostelium discoideum*. Chemistry of Life) 2002; 22(4): 351-3.
- 5 侯连生. gp150蛋白在盘基网柄菌发育中的作用及黏附分子间关系的分析. 动物学报(Hou Liansheng. The role of gp150 and analysis of the relationship between adhesion molecules during *Dictyostelium discoideum* development. Acta Zoologica Sinica) 2004; 50(1): 75-82.
- 6 Wang J, Hou L, Awrey D, Loomis WF, Firtel RA, Siu CH. The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the *lagC* gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during *Dictyostelium* development. Dev Biol 2000; 227(2): 734-45.
- 7 杨 硕, 侯连生. 盘基网柄菌AK127细胞超微结构的观察. 中国细胞生物学报(Yang Shuo, Hou Liansheng. The ultrastructural observation on *Dictyostelium discoideum* AK127 cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2010; 32(4): 569-74.
- 8 侯连生. 盘基网柄菌细胞分化过程中gp150分子的作用. 华东师范大学学报(自然科学版)(Hou Liansheng. Function of gp150 in the differentiation of stalk cell during *Dictyostelium Discoideum* development. Journal of East China Normal University (Natural Science)) 2006; 2: 64-7.
- 9 Mutzel R, Lacombe ML, Simon MN, Gunzburg JD, Veron M. Cloning and cDNA sequence of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(1): 6-10.
- 10 Mann SK, Richardson DL, Lee S, Kimmel AR, Firtel RA. Expression of cAMP-dependent protein kinase in prespore cells is sufficient to induce spore cell differentiation in *Dictyostelium*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(22): 10561-5.
- 11 Van ES, Viridy KJ, Pitt GS, Meima M, Sands TW, Dereotes PN, et al. Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. J Biol Chem 1996; 271(39): 23623-5.
- 12 Mann SK, Yonemoto WM, Taylor SS, Firtel RA. DdPK3, which plays essential roles during *Dictyostelium* development, encodes the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(22): 10701-5.
- 13 Somon MN, Driscoll D, Mutzel R, Part D, Williams J, Véron M. Overproduction of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase blocks the differentiation of *Dictyostelium discoideum*. EMBO J 1989; 8(7): 2039-43.
- 14 Ratner D, Borth W. Comparison of differentiating *Dictyostelium discoideum* cell types separated by an improved method of density gradient centrifugation. Exp Cell Res 1983; 143(1): 1-13.
- 15 李明春, 梁东升, 许自明, 袁锦华. 反相离子对HPLC法测定细胞中蛋白激酶活性. 中国生化药物杂志(Li Mingchun, Liang Dongsheng, Xu Ziming, Yuan Jinhua. Determination of protein kinase activity by ion-pair RT-HPLC. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics) 1999; 20(5): 233-5.
- 16 Alvarez-Curto E, Saran S, Meima M, Zobel J, Scott C, Schaap P. cAMP production by adenylyl cyclase G induces prespore differentiation in *Dictyostelium* slugs. Development 2007; 134(5): 959-66.
- 17 Dynes JL, Clark AM, Shaulsky G, Kuspa A, Loomis WF, Firtel RA. *LagC* is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. Genes Dev 1994; 8(8): 948-958.
- 18 Shaulsky G, Fuller D, Loomis WF. A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. Development 1998; 125(4): 691-9.
- 19 王一铮, 张 敏, 侯连生. 盘基网柄菌野生型KAX-3细胞与突变型AK127细胞的mRNA差异显示. 华东师范大学学报(自然科学版)(Wang Yizheng, Zhang Min, Hou Liansheng. Differential expression analysis of the wild cells KAX-3 and the mutant cells AK127 in *Dictyostelium discoideum*. Journal of East China Normal University (Natural Science)) 2008; 2: 53-8.
- 20 杨春霞, 李 丽, 杨 硕, 王大磊, 侯连生. 盘基网柄菌多细胞体大小调解中细胞计数因子的研究. 细胞生物学杂志(Yang Chunxia, Li Li, Yang Shuo, Wang Dalei, Hou Liansheng. Cell counting factor and its regulation on the size of multicell in *Dictyostelium discoideum*. Chinese Journal of Cell Biology) 2008; 30(6): 727-30.
- 21 Thomason PA, Traynor D, Cavet G, Chang WT, Harwood AJ, Kay RR. An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. EMBO J 1998; 17(10): 2838-45.
- 22 Mann SK, Firtel RA. cAMP-dependent protein kinase differentially regulates prestalk and prespore differentiation during *Dictyostelium* development. Development 1993; 119(1): 135-46.
- 23 Hopper NA, Anjard C, Raymond CD, Williams JG. Induction of terminal differentiation of *Dictyostelium* by cAMP-dependent protein kinase and opposing effects of intracellular and extracellular cAMP on stalk cell differentiation. Development 1993; 119(1): 147-54.
- 24 王大磊, 侯连生. 盘基网柄菌中gp150分子相互作用蛋白质的分离及分析. 中国细胞生物学报(Wang Dalei, Hou Liansheng. Screening and analyzing of gp150-interacting proteins of *Dictyostelium discoideum*. Chinese Journal of Cell Biology) 2010; 32(3): 45-50.
- 25 Li J, Yang S, Billiar TR. Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. J Biol Chem 2000;

- 275(17): 13026-34.
- 26 张树任, 施佳乐, 刘 伟, 陈能星, 侯连生. 盘基网柄菌柄细胞中gp150分子与凋亡蛋白作用分析. 华东师范大学学报(自然科学版) (Zhang Shuren, Shi Jiale, Liu Wei, Chen Nengxing, Hou Liansheng. Functional analysis of gp150 and apoptosis protein in the development of *Dictyostelium discoideum*. Journal of East China Normal University (Natural Science)) 2008; 6: 110-5.
- 27 谭 宁, 施佳乐, 彭建涛, 侯连生. 盘基网柄菌细胞分化和凋亡的形态特征. 动物学报(Tan Ning, Shi Jiale, Peng Jiantao, Hou Liansheng. Morphology of the apoptosis and cell differentiation during *Dictyostelium discoideum* development. Acta Zoologica Sinica) 2006; 52(3): 603-11.

Correlational Study on gp150 and Protein Kinase A During *Dictyostelium discoideum* Development

Tian Li, Chen Yingying, Liang Jingjing, Hou Liansheng*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract When *Dictyostelium discoideum* entered into post-developmental stage, *Dictyostelium discoideum* protein kinase A (DdPKA) activity increased significantly at 12 h, 16 h and 20 h time-points in wild-type cells of KAx-3 which was related to cell morphological differentiation. But the DdPKA activity of *gp150* knocked out cells (AK127) remained at a relative high level and only decreased apparently at 22 h. However, the DdPKA activity of both stains increased at 24 h. Overall, the DdPKA activity in AK127 was higher than in KAx-3. These showed that the loss of gp150 may lead to the regulation of DdPKA activity get out of control. In addition, DdPKA activity in prestalk cells increased slowly from 16 h to 18 h but decreased rapidly at 20 h, while in prespore cells the activity rose up at 20 h after a decline at 18 h which was almost 2-fold of that in prestalk cells. The colocalization study with laser confocal microscopy showed that the positions of two DdPKA subunits were not together with each other and gp150 was much closer to DdPKA-R, and they even overlapped with each other. The results indicate that the interaction between gp150 and DdPKA-R might influences the apoptosis of prestalk cells and the differentiation of prespore cells.

Key words *Dictyostelium discoideum* cAMP-dependent protein kinase A (DdPKA); adhesion molecule glycoprotein gp150; protein-protein interaction

Received: March 21, 2012 Accepted: April 18, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30970316, No.30670266)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn