

gp150 蛋白在盘基网柄菌发育中的作用及粘附分子间关系的分析*

侯连生**

华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

摘要 饥饿的盘基网柄菌进入多细胞发育期, 在发育早期, AK127 细胞 (gp150 突变细胞) 能表达 DdCAD-1 和 gp80 两种粘附分子, 但它们不足以促进细胞继续发育, 发育停留在细胞疏松结合阶段。粘附分子 gp150 调节的细胞与细胞间的粘着影响了细胞丘“突出”的形成, 由此影响了盘基网柄菌多细胞发育的形态发生。TL93 细胞 (DdCAD-1 和 gp80 突变细胞) 能完成发育。主要原因是在细胞流发育阶段就表达了 gp150 分子, 在细胞粘着的功能上有替代 DdCAD-1 和 gp80 的作用。因此 gp150 蛋白对盘基网柄菌多细胞发育有着不可或缺的作用 [动物学报 50 (1): 75 - 82, 2004]。

关键词 盘基网柄菌 gp150 发育 细胞丘

The role of gp150 and analysis of the relationship between adhesion molecules during *Dictyostelium discoideum* development*

HOU Lian-Sheng**

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

Abstract Cells of *Dictyostelium discoideum* are triggered to undergo development when they have depleted their food source. During the early hours of development, cells undergo chemotaxis toward cAMP that is secreted by starving cells and form multicellular aggregates, which finally develop into the fruiting bodies. Cell adhesion molecules play an important role in maintaining the integrity of cell aggregation and influence subsequent cell-type differentiation and cell sorting. Cell-cell adhesion at early stages is important for development, but cell-type differentiation and cell sorting are triggered in the mound stage. Mutants lacking the gp80 gene exhibit no obvious difference in phenotype when they develop under standard conditions. Perhaps related proteins make compensation for the mutant. gp150 is normally first expressed at the mound stage so the question is whether the adhesion molecule is important for development beyond this stage? To better understand the role of gp150, we compared mutant cells and wild-type cell with Western blot and immunofluorescence labeling. AK127 cell (gp150/LagC null cell) expressed both DdCAD-1 and gp80 on the cell surface during early development, arrested at the loose aggregation stage. gp150 that regulated the cell aggregation, influenced the formation of the tip of mound. TL93 cells have no obvious difference in phenotype when developed under standard laboratory condition. Premature change in gp150 gene expression was observed, which perhaps compensate the other related adhesion proteins. gp150 is required for the development of *Dictyostelium discoideum* [Acta Zoologica Sinica 50 (1): 75 - 82, 2004].

Key words *Dictyostelium discoideum*, gp150, Development, Mound

社会变形虫盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 在营养丰富的条件下, 以二分裂方式繁殖生长; 当食物耗尽时, 进入多细胞发育阶段, 类似高等生物的胚胎发育, 包括细胞黏着和细胞分化。它们发育周期短, 整个周期约需 24 h, 各阶段

的特征也很清楚 (Aubry and Firtel, 1999), 适合研究细胞与细胞间的相互作用及细胞粘附分子对发育的影响。盘基网柄菌的发育过程可分为 4 个阶段: 1) 细胞聚集 (Aggregation) 阶段, 剥夺食物后, 饥饿细胞分泌的化学信号 cAMP 诱导邻近的

2003-03-25 收稿, 2003-11-07 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170107) [This research was funded by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30170107)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

饥饿细胞向 cAMP 来源方向移动, 形成细胞流样结构; 2) 细胞丘 (Mound), 细胞向聚集中心聚集, 形成多细胞组成的丘状结构, 该阶段的细胞有了初步分化; 3) 蛞蝓体 (Slug) 阶段, 细胞丘垂直向上延伸形成指状突出 (Tip), 这一指状结构倒向基质, 形成“蛞蝓”, 蛞蝓体在迁移过程中细胞经历了进一步的分化 (Coates and Harwood, 2001); 4) 子实体 (Fruiting body) 形成阶段, 蛞蝓体迁移到合适的地方后形成子实体。子实体是由柄细胞和基盘细胞支撑的含大量休眠孢子的顶囊组成的多细胞体。盘基网柄菌为发育进程和保持细胞聚集体的完整性, 在发育的不同阶段表达了特定的细胞粘附分子。这些分子还传递了为细胞分化必需的信号 (Gerisch, 1980; Siu, 1990; Fontana, 1995; Siu et al., 1997)。盘基网柄菌至少依赖 4 种细胞粘着位点来维持多细胞体。细胞发育开始后不久, 出现 EDTA/EGTA 敏感粘着位点, 1 - 2 mmol/L EDTA 就可以阻断其结合, 由分子量 24 kD 的钙结合蛋白 DdCAD-1 调节 (Knecht et al., 1987; Brar and Siu, 1993; Wong et al., 1996)。之后出现 EDTA 敏感/EGTA 抗性位点 (Fontana, 1993), 其分子的性质目前还不太清楚。EDTA 抗性位点称为结合位点 A, 也称为 gp80 (Beug et al., 1973; Muller and Gerisch, 1978; Siu et al., 1985), EDTA 浓度高达 15 mmol/L 都能稳定维持细胞间的黏着, 为发育的聚集阶段所需。在后聚集阶段, gp150 调节了另一种类型的 EDTA 抗性位点 (Geltosky et al., 1979; Gao et al., 1992)。最初把 gp150 看作为伴刀豆球蛋白 A 结合糖蛋白 (Geltosky et al., 1976)。我们的研究证实由 LagC 基因编码 gp150 分子, 一个 97 kD 蛋白, 被高度糖基化后, SDS-PAGE 电泳结果为 150 kD。搜索 Pfam 数据库, 显示 gp150 有潜在的 IPT 序列, 有哺乳类 plexin 和 MET 受体蛋白中发现的免疫球蛋白样折叠。它们是异嗜性细胞表面粘附分子, 但它们配体的性质还很不清楚。通过这种细胞间异嗜性粘着的相互作用来调节细胞的粘着, 以此来调节细胞类型的分化 (Wang et al., 2000)。但是 gp150 分子与盘基网柄菌多细胞发育的形态发生的关系及究竟怎样来影响细胞的发育还不是很清楚。本工作用免疫方法研究了 gp150 分子在盘基网柄菌多细胞发育中的作用, 为细胞粘着及粘附分子在多细胞发育进程中的作用提供有用的信息。

1 材料和方法

1.1 细胞株和细胞培养

野生型细胞 KAx-3 是纯系培养的细胞株。AK127 细胞来源于 KAx-3 细胞, 是 LagC 基因被剔除的突变细胞。TL93 细胞是 DdCAD-1 和 gp80 基因被剔除的突变细胞。细胞培养在琼脂 (SM 琼脂: 10 g 细菌蛋白胨或胰蛋白胨, 1.0 g 酵母粉, 1.9 g 磷酸二氢钾, 0.6 g 磷酸氢二钾, 10 g 葡萄糖, 1.0 g Mg_2SO_4 硫酸镁, 20 g 琼脂, 加水至 1 L, pH 6.0 - 6.4, 灭菌。)平板上, 用 *Klebsiella aerogenes* 喂养。在对数期收集细胞, 用磷酸缓冲液 (pH 6.4) 洗净细菌。制成 2×10^8 /ml 细胞悬浮液, 在蒸馏水配制的 2% 琼脂平板进行发育。或者 2×10^6 /ml 细胞悬浮在 MCM 缓冲液中 [20 mmol 2-(N-morpholino) ethanesulfonic, pH 6.8, 0.2 mmol $CaCl_2$, 2 mmol $MgCl_2$], 在预先涂有 0.1% (w/v) 多聚赖氨酸的盖玻片上加 0.5 ml 细胞悬浮液, 静置 10 min, 吸去 0.4 ml 缓冲液。将盖玻片放潮湿房内, 25 °C 室温下进行发育。

1.2 免疫印迹

按 Laemmli (1970) 法进行 SDS-PAGE。每隔 2 h 收集不同发育阶段的细胞, 1×10^7 细胞溶于 100 μ l 含 2% SDS 和 2% β -巯基乙醇的样品液中, 沸水加热 5 min。电泳后进行 Western blot 分析; 用 5% 脱脂奶封闭硝酸纤维薄膜, 培育在按一定比例稀释的抗 gp150 抗体溶液中 1 h, 用碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 检测已连接的抗体。抗 gp80 抗体是单克隆抗体, 用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 检测已连接的抗 gp80 抗体。高分子量标准蛋白为 BIO-RAD 产品。

1.3 免疫染色

盖玻片上的盘基网柄菌细胞发育直到拔顶阶段, 室温下, 用 3.7% 甲醛 (用 17 mmol 磷酸缓冲液配制, pH 6.4) 固定细胞 15 min。再用 -20 °C 预冷的含 1% 甲醛的甲醇固定 5 min。然后用抗 gp150 抗体培育 1 h (用含 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液按 1:100 稀释)。用含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗 3 次。用 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 培育 1 h (1:300 稀释)。用含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗 3 次。盖玻片用浸片液封片 (Mounting solution: 80% 甘油, 2.5% DABCO, 17.5% PBS)。激光共聚焦显微镜观察。激光共聚焦显微镜为 Zeiss Axiovert 135 倒置显微镜, 16 \times 和 63 \times

Neofluor 物镜, LSM 410 激光共聚焦装置。

双免疫标记实验按上述方法进行, 固定细胞, 依次用鼠抗 gp80mAb80L5C4 抗体、抗 DdCAD-1 抗体 (Siu et al., 1985; Wu et al., 1992) 和抗 gp150 抗体培育, 然后用荧光标记的 2 抗培育, 共聚焦显微镜观察。所有 2 抗均是 BIO-RAD 产品。

2 结果

2.1 gp150 分子的亚细胞定位

细胞粘附分子要行使粘着功能必须要位于细胞表面。为此我们首先要确定 gp150 的亚细胞定位。在 KAx-3 细胞发育 16 h 时, 把后聚集阶段的多细胞体打散, 使之成为分散的单个细胞。 2×10^6 细胞置于涂有多聚赖氨酸的盖玻片上, 使细胞重聚集。打散的细胞静置 60 min 后, 进行免疫染色, 结果发现在重聚集的细胞与细胞的接触区域有着强烈的 gp150 染色 (图版 : 1), 可见它们是位于细胞表面, 作为一种粘附分子使细胞粘着在一起。

2.2 盘基网柄菌多细胞发育中 gp150 出现的时间

我们用 Western blot 检测了发育期间 LagC 基因无效突变株系 AK127 细胞 gp150 表达情况, 用抗 gp150 抗体检测不到 AK127 细胞有 gp150 蛋白条带 (图 1B)。但野生型细胞发育 10 h 后就能检测到 gp150 条带。随发育进程, gp150 分子的量也成倍增加。并且在野生型细胞发育 14 h 后细胞的 Western blot 中, 可以明显看到有两条免疫染色条

带 (图 1A)。

2.3 gp150 在 AK127 细胞发育中的作用

在盘基网柄菌多细胞发育早期主要表达两种黏附分子, DdCAD-1, 是一种钙结合蛋白, gp80 是一种糖蛋白, 负责细胞间的同嗜性黏着。在琼脂平板上发育的 AK127 细胞发育至约 10 h 时, 开始形成小的聚集体。细胞表达了 DdCAD-1 和 gp80 两种粘附分子。DdCAD-1 主要缔合在聚集体四周的表面和细胞膜的突出处; 而 gp80 则主要位于细胞与细胞接触的区域 (图版 : 2)。发育至 12 h 时, 形成正常的细胞流样结构, 细胞黏附分子 DdCAD-1 和 gp80 表现出不同的亚细胞分布模式; DdCAD-1 位于聚集体外周细胞层, gp80 则位于聚集体的内层和细胞与细胞接触的区域 (图版 : 4, 6)。这些发育现象与野生型细胞发育现象相似 (图版 : 3, 5)。在这之后, 若是野生型细胞的发育则进入后聚集阶段, 细胞结合更加紧密, 形成多细胞组成的细胞丘, 随后开始拔尖, 在细胞丘的上部形成指状突出物 (图版 : 7)。而 AK127 细胞发育约 16 h 时, 只能形成盆地样多细胞体, 盆的边缘呈很强的 gp80 免疫染色, 特别是细胞与细胞接触的区域; 盆的中间的免疫染色很浅 (图版 I: 8)。在盆地样多细胞体边缘是 DdCAD-1 染色细胞。与野生型细胞的细胞丘比较后, 发现盆地样多细胞体边缘细胞粘着较疏松, 而野生型细胞丘边缘细胞粘着紧密, 而且有一层外膜包裹细胞丘 (图版 I: 7)。看来

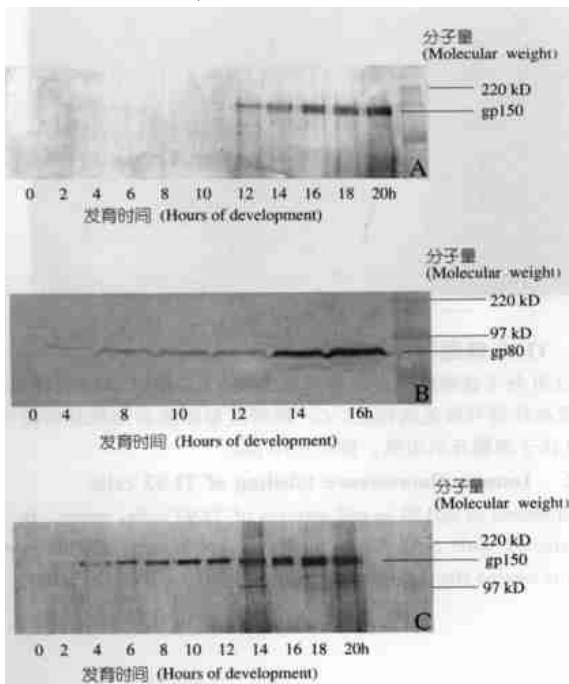


图 1 盘基网柄菌发育期间 gp150 和 gp80 的免疫印迹

每隔 2 h 收集野生型 KAx-3 和突变型 AK127 细胞, 用 Western blot 分析 gp150 的表达。A. KAx-3 细胞在 10 h 后开始表达 gp150, 在 14 h 后出现两条免疫反应条带。B. AK127 细胞没有 gp150 免疫染色条带, gp80 则正常表达。C. 与野生型细胞相比, TL93 细胞 gp150 分子出现的时间明显早于野生型细胞 gp150 分子出现的时间。

Fig. 1 Western blot of gp150 and gp80 during Dictyostylium development

KAx-3, AK127 and TL93 cells are developed on water agar and then collected at 2 hour intervals for Western blot analysis. A. After 10 hours, KAx-3 cells express gp150, show two bands at approximately 150 kD and 145 kD. B. AK127 cells do not show gp150 immunostained bands, and normally express the gp80. C. gp150 is expressed earlier in TL93 cells than KAx-3 cells.

gp150 与细胞丘外膜的形成有一定关系。AK127 细胞发育受阻, 只能停留在这个时期, 发育再也不能进行下去。但野生型细胞 KAx-3 则能形成细胞丘, 继续发育形成指状的突出物, 完成多细胞的发育。

2.4 Gp150 在 TL93 细胞发育中的作用

在 DdCAD-1 和 gp80 双突变细胞 TL-93 细胞株中, 发育 8 h 就能清晰显示 gp150 免疫染色条带, 甚至在发育 6 h 时就能发现 gp150 免疫染色条带 (图 1C)。为了进一步证实 Western blot 的结果, 我们对突变细胞 TL-93 进行了免疫染色。TL-93 细胞整个早期发育的整个形态发生过程和野生型细胞相同, 细胞聚集, 形成细胞流样结构和形成细胞丘结构。但与野生型细胞明显不同的是, 在细胞流阶段就出现 gp150 分子免疫染色, 不但在细胞流中间的细胞间接接触区域, 而且在细胞流边缘细胞间接接触区域都有明显染色区域 (图 2A)。用抗 gp80 抗体染色不能显示任何免疫染色 (图 2B)。在细胞丘结构四周有明显的免疫染色, 而中间的细胞则不能显示任何明显免疫染色 (图 2C)。

3 讨论

LagC 基因编码 gp150 蛋白 (Wang et al., 2000)。在细胞疏松聚集阶段, LagC 基因开始表达, 其后的整个发育阶段都有 LagC mRNA (Dynes et al., 1994)。本实验结果也证实了这一点。在发育后 10 h, 野生型细胞 KAx-3 就能检测到

gp150。在我们的实验条件下, 12 h 发育处在疏松聚集阶段; 这时应开始出现依赖 gp150 的细胞粘着 (Lam et al., 1981; Gao et al., 1992)。并且随着发育的进程, gp150 蛋白量也不断增加, 因此 gp150 积聚和依赖 gp150 的细胞与细胞粘着位点的表达与盘基网柄菌细胞发育时间和空间是紧密相关的。野生型细胞发育 14 h 后, gp150 出现两条条带, 其中一条带的分子量为 145 kD。但为何会出现两条条带, 是否和多细胞发育有关还不是很清楚, 我们曾发现其中有一条蛋白带的酪氨酸可被磷酸化, 因此是 gp150 蛋白的两种亚型发挥不同的功能, 还是 gp150 蛋白部分水解的产物? 但即便是部分水解的产物, 可能还是有一定功能的, 对此我们还需要进行深入的研究。AK127 细胞的 Western blot 不能显示 gp150, 这种突变细胞多细胞发育的形态发生就不能正常进行, 最终也不能形成子实体。显然 gp150 在盘基网柄菌多细胞发育中有着十分重要的作用。DdCAD-1 主要负责早期发育细胞的粘着, gp80 则在细胞流样结构形成中起作用。AK127 细胞在早期发育中, 可以表达这两种粘附分子; 并且在细胞疏松结合阶段向紧密结合阶段转变过程中有过表达的现象; 即使如此这两种分子还是不足以促进多细胞完成发育。我们知道多细胞的发育是循序渐进的, 特别是发育的转折点, 需要表达一些关键和重要的分子, gp150 就是这样一种粘附分子; 缺少 gp150 分子, 盘基网柄菌多细胞发育就不能正常

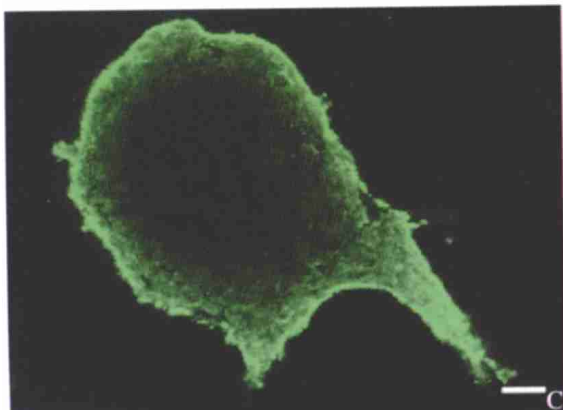
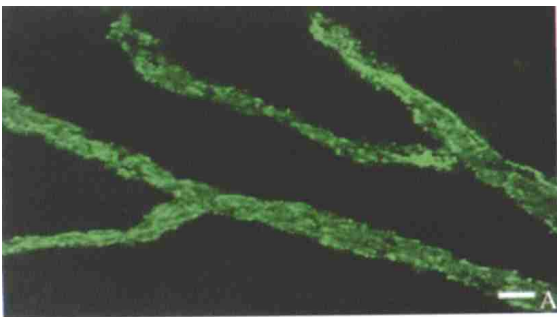


图 2 TL93 细胞的免疫染色

A. gp150 分子在细胞流阶段就开始出现。B. 用抗 gp80 抗体免疫染色, 没有任何可染色的标记。C. 同野生型细胞的细胞丘阶段一样, gp150 位于细胞丘的边缘, 标尺 = 10 μm 。

Fig. 2 Immunofluorescence labeling of TL93 cells

A. Expression of gp150 in cell streams of TL93 cells, green. B. Cells were stained with mAb 80L5C4 against gp80, red. C. As normal, gp150 is located the periphery of mound, green). Bar = 10 μm .

进行下去。从我们的结果中可以看出 gp150 对细胞丘和细胞丘的指状“突出”的形成是不可或缺的。我们推测这种“突出”类似胚胎发育中的组织中心, 缺少这种中心, 细胞就不能分化, 发育就不能进行下去。

解聚试验证实 gp150 是一种膜蛋白, 在细胞与细胞接触区域特别丰富。它们通过异嗜性相互作用来调节细胞间的紧密粘着 (Wang et al., 2000)。而在细胞聚集早期阶段表达的 DdCAD-1 和 gp80 通过同嗜性相互作用调节细胞间的粘着 (Siu et al., 1987; Kamboj et al., 1988, 1989; Brar and Siu, 1993)。所以 gp150 分子调节细胞与细胞间粘着的机制是不同的。正是这种不同的机制使多细胞发育从疏松结合向紧密结合的转变。在细胞丘形成阶段, 这种紧密粘着影响了细胞的许多功能, 其中也包括许多和细胞粘着作用有关的组分, 我们已发现突变细胞缺少某些细胞骨架成分 (未发表数据); 或许粘附分子 gp150 在粘着时是形成一个复合体, 这种复合体既能发挥细胞粘着的功能, 又能起到信号传递的作用, 因为有证据表明细胞骨架成分是粘着复合体的重要的组成成分 (Burridge and Chrzanoska-Wodnicka, 1996; Zamir and Geiger, 2001)。比较图版 : 7 和图版 : 8 我们还发现野生型细胞丘外有一层外膜物质, 这层外膜使细胞能够在相对独立的微环境中完成发育。而突变型细胞外面没有这层外膜。gp150 分子所在的空间位置与这层外膜最近, 它们表达的时间和这层外膜出现的时间相差不多。所以, 我们推测 gp150 分子与这层外膜的形成有一定的关系。

发育中粘附分子的表达既有时空上的关系, 在功能上也是互相关联的。gp80 的表达依赖于 DdCAD-1 的功能, 用 EDTA 或肉碱阻止 DdCAD-1 调节的粘着时, 大大地降低 gp80 的表达。没有 DdCAD-1 调节的细胞接触, 即使用 cAMP 脉冲信号刺激也不能恢复 gp80 的表达 (Desbarats et al., 1994)。这两种分子间的关系对盘基网柄菌的早期发育是有重要作用, 但是缺少它们并不会影响盘基网柄菌的发育, TL93 细胞实验结果证实了这一点。究其主要, 原因是 TL93 细胞可以表达 gp150 分子并且还提前表达。在我们以前的研究中发现, 细胞如果缺失 gp80 一种粘附分子, gp150 分子约提前 2 h 表达 (Wang et al., 2000); 在 TL93 细胞中, 由于缺失 DdCAD-1 和 gp80 两种粘附分子, gp150 分子则至少提前 4 h 表达。因此我们认为这三

种粘附分子在功能上有密切的联系。我们推测在细胞间互相粘着的功能上, gp150 分子有替代 DdCAD-1 分子和 gp80 分子功能的作用, 使盘基网柄菌细胞能够顺利地多细胞发育。这从另一个侧面提示了 gp150 分子在盘基网柄菌多细胞发育中有着十分重要作用。因此深入探索 gp150 分子在盘基网柄菌发育中的作用对阐明粘附分子在多细胞发育中的作用将是十分有意义的。

致谢 真诚感谢加拿大多伦多大学 Dr. Chi-Hung Siu 惠赠野生型细胞和突变型细胞、抗 DdCAD-1 抗体、抗-gp80 抗体和抗-gp150 抗体。

参考文献 (References)

- Aubry L, Firtel R, 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostylium* differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 469 - 517.
- Beug H, Katz F, Gerisch G, 1973. Dynamics of antigenic membrane sites relation to cell aggregation in *Dictyostylium discoideum*. *J. Cell Biol.* 56: 647 - 658.
- Brar SK, Siu CH, 1993. Characterization of the cell adhesion molecule gp24 in *Dictyostylium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 268: 24 902 - 24 909.
- Burridge K, Chrzanoska-Wodnicka M, 1996. Focal adhesion, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 463 - 519.
- Coates JC, Harwood AJ, 2001. Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostylium* development. *J. Cell Sci.* 114: 4 349 - 4 358.
- Desbarats L, Brar SK, Siu CH, 1994. Involvement of cell-cell adhesion in the expression of the cell cohesion molecule gp80 in *Dictyostylium discoideum*. *J. Cell Sci.* 107: 1 705 - 1 712.
- Dynes JL, Clark AM, Shauly G, Kuspa A, Loomis WF, Firtel RA, 1994. LagC is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in *Dictyostylium*. *Genes Dev.* 8: 948 - 958.
- Fontana DR, 1993. Two distinct adhesion systems are responsible for EDTA-sensitive adhesion in *Dictyostylium discoideum*. *Differentiation* 53: 139 - 147.
- Fontana DR, 1995. *Dictyostylium discoideum* cohesion and adhesion. In: Richardson PD, Steiners M, ed. *The Principles of Cell Adhesion*. Boca Ration, FL: CRC Press, 63 - 86.
- Gao EN, Shir P, Siu CH, 1992. Purification and partial characterization of a cell adhesion molecule (gp150) involved in postaggregation stage cell-cell binding in *Dictyostylium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 267: 9 409 - 9 415.
- Geltsky JE, Siu CH, Lerner RA, 1976. Glycoproteins of the plasma membrane of *Dictyostylium discoideum* during development. *Cell* 8: 391 - 396.
- Geltsky JE, Weseman J, Bakke A, Lerner RA, 1979. Identification of a cell surface glycoprotein involved in cell aggregation in *Dic-*

- Dictyostelium discoideum*. Cell 18: 391 - 398.
- Gerisch G, 1980. Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in *Dictyostelium*. Curr. Top. Dev. Biol. 14: 234 - 270.
- Kamboj RK, Wong LM, Lam TY, Siu CH, 1988. Mapping of a cell-binding domain in the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium discoideum*. J. Cell Biol. 107: 1 835 - 1 843.
- Kamboj RK, Cariepy J, Siu CH, 1989. Identification of an octapeptide involved in homophilic interaction of the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium discoideum*. Cell 59: 615 - 625.
- Knecht DA, Fuller DL, Loomis WF, 1987. Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of *Dictyostelium discoideum*. Dev. Biol. 121: 277 - 283.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 - 685.
- Lam TY, Pickring G, Geltosky J, Siu CH, 1981. Differential cell cohesiveness expressed by prespore and prestalk cells of *Dictyostelium discoideum*. Differentiation 20: 22 - 28.
- Muller K, Gerisch G, 1978. A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium* cells. Nature 274: 445 - 449.
- Siu CH, 1990. Cell-cell adhesion molecules in *Dictyostelium*. Bio Essays 12: 357 - 362.
- Siu CH, Cho A, Choi AHC, 1987. The contact site A glycoprotein directly mediates cell-cell adhesion by homophilic interaction in *Dictyostelium discoideum*. J. Cell Biol. 105: 2 523 - 2 533.
- Siu CH, Lam TY, Choi AHC, 1985. Inhibition of cell-cell binding at the aggregation stage of *Dictyostelium* by monoclonal antibodies directed against the contact site A glycoprotein. J. Biol. Chem. 260: 16 030 - 16 036.
- Siu CH, Harris TJC, Wong EFS, Yang C, Sesaki H, Wang J, 1997. Cell adhesion molecules in *Dictyostelium*. In: Maeda Y, Inouye K, Takeuchi I, ed. *Dictyostelium: A model System for Cell and Developmental Biology*. Tokyo: Universal Academy Press, 111 - 121.
- Wang J, Hou L, Awrey D, Loomis WR, Firtel RA, Siu CH, 2000. The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the LagC gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during *Dictyostelium development*. Dev. Biol. 227: 734 - 745.
- Wong EFS, Brar SK, Sesaki H, Yang C, Siu CH, 1996. Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, A Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule in *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 271: 246 - 249.
- Wu XF, Kamboj RK, Cariepy J, Siu CH, 1992. The 80L5C4 epitope overlaps with the homophilic binding site of the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium*. Biochem. Cell Biol. 70: 246 - 249.
- Zamir E, Geiger B, 2001. Components of cell adhesion. J. Cell Sci. 114: 3 577 - 3 579.

图 版 说 明

1. gp150 定位在聚集细胞的细胞表面和细胞接触区, 野生型细胞 KAx-3 在琼脂平板上发育至 16 h, 用 20 mmol EDTA 磷酸缓冲液打散细胞, 用 1 抗和 2 抗免疫染色, 在细胞和细胞接触区有明显的 gp150 染色区, 1a 是该免疫染色的阴性对照, 标尺 = 10 μm 。
- 2 - 6. 发育早期的野生型细胞和突变型细胞。在发育早期, 野生型细胞和突变型细胞形态发生相似, 能产生细胞聚集, 都能表达 DdCAD-1 和 gp80 两种粘附分子。绿色为 DdCAD-1, 红色是 gp80。
2. 能正常聚集的突变细胞, 标尺 = 25 μm 。
3. 正常聚集的野生型细胞, 标尺 = 10 μm 。
4. 突变细胞的细胞流, 标尺 = 25 μm 。
5. 野生型细胞的细胞流, 标尺 = 25 μm 。
6. 进入细胞疏松聚集阶段的突变细胞, 标尺 = 25 μm 。
7. 细胞丘阶段的 KAx-3。红色是 gp80, 绿色是 gp150, 标尺 = 25 μm 。
8. 发育停留在细胞疏松聚集阶段的 AK127 细胞。红色是 gp80, 绿色是 DdCAD-1, 标尺 = 25 μm 。

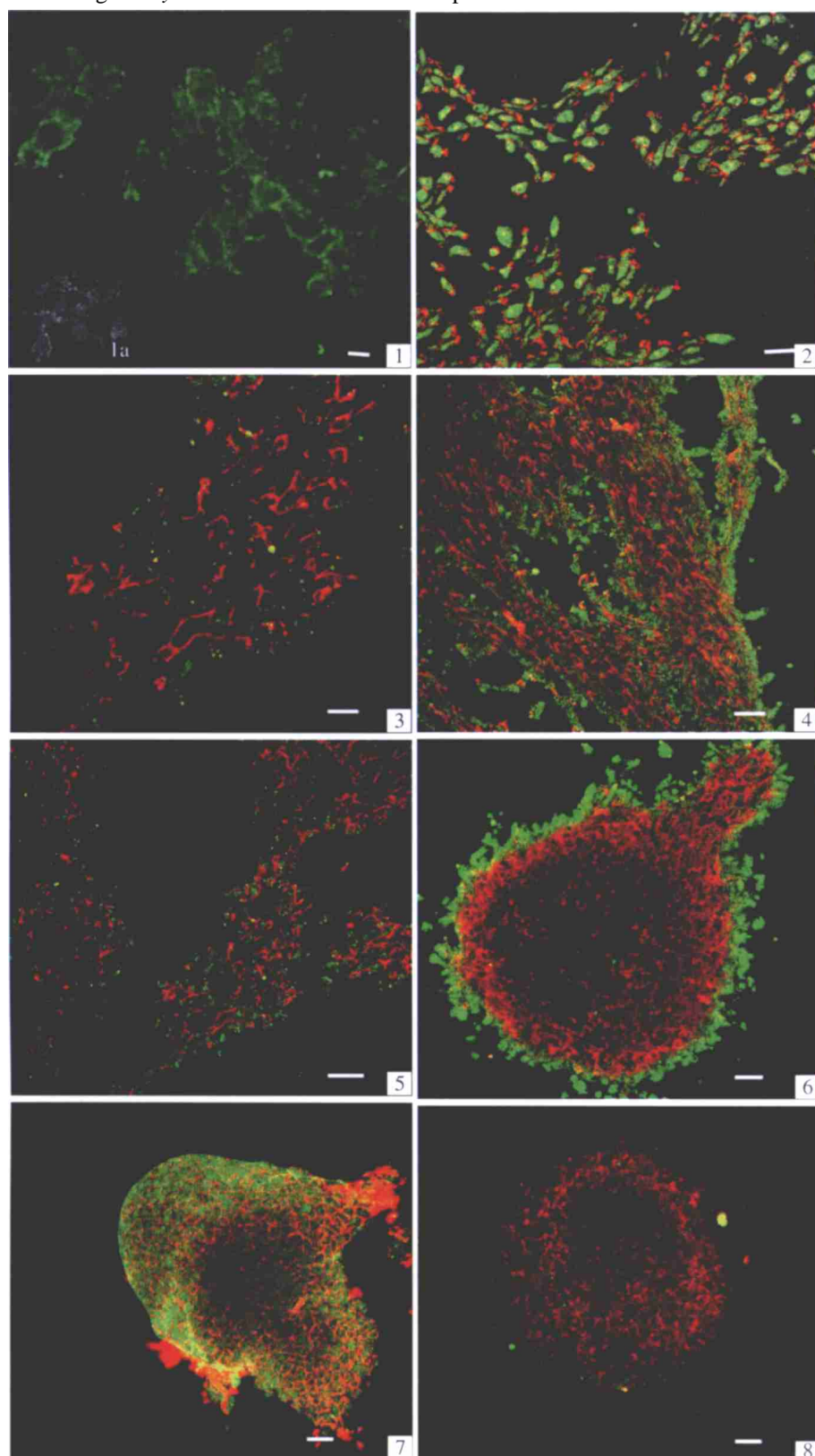
Explanation of Plate

1. Localization of gp150 at the cell surface and contact regions of cell aggregation. KAx-3 cells were developed on plain agar for 16 h, dissociated by EDTA, and settled on poly-lysine-coated coverslips for re-forming aggregation in MCM buffer. After 60 min cells were fixed with 20% methanol and stained with anti-gp150 antibody. gp150 were localized on cell surface and contact regions of cell aggregation. 1a is negative control. Bar = 10 μm .
- 2 - 6. Mutant cells and wildtype cells during early development. Mutant strain AK127 cells expressing both gp80 and DdCAD-1, started to form small aggregation when developed on plain agar, similar to those observed with wildtype cells. Green is DdCAD-1, red is gp80.
2. Normal aggregation of mutant strain AK127. Bar = 25 μm .
3. Normal aggregation of wildtype KAx-3. Bar = 10 μm .
4. Cell stream of AK127. Bar = 25 μm .
5. Cell stream of KAx-3. Bar = 25 μm .
6. AK127 cells at loose aggregation stage. Bar = 25 μm .
7. Wild type strain KAx-3 cells are at the mound stage. Red is gp150, green is gp80. Note: comparing the mutant strain AK127, KAx-3 normally make the sheath to envelope the cell mound. Bar = 25 μm .
8. Mutant strain AK127 development was arrested at the loose aggregation stage. Red is gp80, green is DdCAD-1. Bar = 25 μm .

侯连生：gp150 蛋白在盘基网柄菌发育中的作用及粘附分子间关系的分析

图版

HOU Lian-Sheng: The role of gp150 and analysis of the relationship between adhesion molecules during *Dictyostelium discoideum* development



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)