

Amoeba proteus xD Strain의 변이주 특이성 단백질의 운명

안 태 인
(서울대학교 생물교육과)

The Fate of Strain-Specific Protein in xD Strain of *Amoeba proteus*

Tae In Ahn

(Department of Biological Education, Seoul National University)

(Received April 8, 1983)

SUMMARY

Cytosol protein patterns of two strains of *A. proteus*, tD and xD strain, were compared by two dimensional gel electrophoresis. Among the 200 major polypeptides that could be stained by silver stain method, tD strain contained a cell specific protein whose molecular weight was 45,000 dalton, pI 5.9. On the other hand, the cytosol and the symbiotic vesicles of xD strain contained a symbiosis specific protein (M.W. 29,000; pI 5.5). The fate of the symbiosis specific protein depended on the presence of symbiotic bacteria in the experiment of high temperature effect and of experimental infection. The significance of these results is discussed in relation to their function in organismic association on the basis of the previous findings.

서 론

*Amoeba proteus*의 xD strain은 1966년 모체인 tD strain의 박테리아에 의한 감염에 의해 형성되었다 (Jeon & Lorch, 1967). 이 그람 음성인 봉상 박테리아의 감염은 당초에 다음과 같은 몇가지의 유해성을 나타내었다. 정상적인 tD 아메바에 비해 세포의 크기가 줄어들고, 세포막의 유연성 감소로 쉽게 깨어지며, 아사율 (Death rate by starvation)이 훨씬 높았으며 생존율 (Clonability)이 현저하게 감소하였다. 감염된지 1년후부터 이같은 유해성은 점차 줄어들기 시작했고, 아메바 한마리당 박테리아 수는 60,000~150,000 이었다. 이 공생 아메바는 그 후 실험실내의 배양조건 하에서 상호 유기체 작용을 통하여 각각의 특성에 많은 변화가 있었음이 계속된 연구에서 밝혀졌고 (Jeon, 1972; Jeon & Jeon, 1976), 지난

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임

18년간 미국 테네시 대학의 Dr. Kwang W. Jeon의 실험실에서 연구되어 왔으며, 한국에는 1981년 분주혜은 이래 성공적으로 배양되고 있다.

이 공생 아메바가 가지고 있는 세포생물학적 특성중 감염 미생물체가 숙주의 세포 내에서도 소화되지 않고 라이소소오ムの 융합을 저해함으로써 번식할 수 있는 것은 포유동물의 백혈구 (macrophage)나 조직세포에 잠복 또는 기생하는 박테리아 또는 원생동물, 예를 들면 문둥병원균이나 결핵균인 *Mycobacterium*, *Toxoplasma*, *Chlamydia* 등의 경우와 비교될 수 있다 (Ahn & Jeon, 1982; Armstrong & Hart, 1971; Brown *et al.*, 1969; Jones & Hirsch, 1972). 이들 미생물은 숙주 세포의 식작용 경로를 통해 침입한 후 숙주의 소화작용에 저항성을 가지거나 라이소소오ムの 융합을 저해함으로써 소화되지 않고, 또한 세포 밖으로 배출되지도 않은 채 세포내 증식이 가능하지만 라이소소오ムの 융합 특이성과 함께 그 기작에 대한 이해는 거의 전무한 상태이다 (Ahn & Jeon, 1979; Dingle, 1968; Jacques, 1969; Silverstein *et al.*, 1977).

포유동물이나 다른 원생동물이 가지고 있는 세포내 기생 또는 공생체에 비해 xD strain은 10여년이란 짧은 기간에 기생체로 침입한 박테리아가 공생체의 단계를 넘어 숙주핵이 완전히 의존한 단계에 이르렀음이 이 아메바를 재료로한 일련의 실험에서 밝혀졌다 (Jeon & Jeon, 1976; Jeon & Ahn, 1978; Lorch & Jeon, 1980). 이는 안정된 생물 공생 관계의 발전이 긴 세월을 거쳐 이룩될 수 있는 것이어서 우리의 관찰 범위 밖의 것이라는 종전의 상식을 능가하고 있어 주목이 되고 있다 (Kimball, 1978; Margulis, 1976; Taylor, 1974). 세포의 핵이식 및 미량주사 실험 결과 숙주의 박테리아에 대한 의존도가 처음으로 나타났고 (Jeon, 1972), 기생체였던 박테리아는 무해할뿐 아니라, 숙주는 박테리아의 존재하에서만 생장 가능성이 증명되었다 (Jeon & Jeon, 1976). xD strain에서 순수분리한 박테리아를 아메바의 식작용을 통해 실험적으로 tD strain에 감염시킨 경우 박테리아의 당초의 유해성은 전혀 찾아볼 수 없이 되었으며 (Ahn & Jeon, 1979) 수차에 걸친 노력에도 공생 박테리아는 세포의 (*in vitro*) 배양이 불가능 하였음은 이 박테리아의 공생을 통한 변화 내지는 숙주에 대한 의존도를 잘 보여 주고 있다.

숙주 핵은 chloramphenicol 처리 또는 고온 (26.5°C) 배양에 의해 박테리아를 제거시키면 그 기능이 상실되었고 (Jeon & Ahn, 1978; Jeon & Hah, 1977; Lorch & Jeon, 1980), 이때 공생박테리아의 미량주사로 회생할 수 있었다 (Lorch & Jeon, 1980). 고온 배양에 대한 감수성 및 박테리아에 대한 의존도는 실험 감염 18개월이면 획득되었으며 이는 아메바의 200세대에 해당하는 기간이다 (Jeon & Ahn, 1978). tD 아메바와 실험 감염시킨 아메바간의 핵이식을 통한 strain 특이성 실험 결과에 따르면 감염 4주 만이면 세포질내에 박테리아의 존재로 인하여 아메바의 핵에 환원될 수 없는 변화가 초래되었으며 (Lorch & Jeon, 1981), 핵은 단지일내 (10세대)에 치사효과를 획득하였다 (Lorch & Jeon, 1982).

이상에서 기생체로 시작한 공생 박테리아는 숙주세포 핵의 변화를 야기시키며 필요 불가분의 세포 기관자로 발전을 보게 되었으므로 이 공생체에 대한 생리 생화학적 연구는 전핵 세포의 기관자의 기원을 밝히는 산 표본이 될 수 있다. 최근 2차원 전기 영동에 의해 xD strain 특이성 단백질을 탐지하였고 (Ahn & Jeon, 1983), 본고에는 공생에 의한 tD strain 특이성 단백질 손실결과를 보고하고 이상 두단백질의 세포공생 특성을 논의한다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

*A. proteus*의 tD와 xD strain (Jeon & Lorch, 1967)은 Chalkley's 무기염류 배양액 (Jeon & Jeon, 1975)에서 *Colpidium*을 먹이로 지정배양 (stock culture)하고 월 1회 배지를 바꾸어 주었다. 대량배양 (mass culture)은 무균 배양한 *Tetrahymena*를 먹이로 하였다 (Goldstein & Ko, 1976). 아메바는 직경 18 cm, 깊이 2 cm 샤페에 2×10^5 밀도로 키웠으며, 배양액과 먹이는 하루 건너씩 배양기와 함께 갈아 주었다. 이렇게 하여 혼련된 조원 현사림이 주간 15시간 정도 일하이 3 gm 가량의 세포 (wet cell)를 얻을 수 있었다. 아메바는 20°C에서 정상 배양하고 27°C에서 고온 배양하였다 (Jeon & Ahn, 1978).

2. 아메바의 실험 공생

xD strain에서 추출한 공생 박테리아를 아메바의 식작용을 통해 tD strain에 감염 시킴으로써 실험 공생 아메바를 만들었다 (Ahn & Jeon, 1979). 공생 박테리아는 이미 개발된 방법에 의해 xD strain으로 부터 순수 분리하였다 (Ahn & Jeon, 1982). 원심분리(170 g, 1분)로 가라 앉힌 1 ml의 xD 아메바 (3.8×10^5 cell/ml)를 2 ml의 냉각된 0.02 M Tris HCl 완충액, pH 7.4 (이하 TH 완충액)에 분산 시킨 다음, glass homogenizer로 가볍게 미쇄하였다. 균질화된 시료를 1,500 g에서 5분간 원심분리할 상층액을 모아서, 다시 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 약간의 불순물을 포함한 박테리아를 튜브 바닥에 모았다. 상층액을 제거한 후 pellet을 2회 반복 freezing & thawing하여 불순물인 세포 미세 구조체를 파괴시킨 다음 다시 원심분리로 모아서 깨끗한 박테리아를 얻을 수 있었다. 최종으로 순수 분리는 sucrose step gradient 원심분리법을 이용하였다. 4,000 g에서 10분간 원심분리후 30%와 40% 경계면에서 순수분리 하였다.

이와같이 순수분리한 박테리아를 0.05% poly-L-lysine을 함유한 Chalkley's 배양액에 15분간 전처리한 다음, 깨끗이 씻어 준비된 tD 아메바 배지에 1×10^8 농도로 주어서 세포의 식작용을 통해 감염시켰다. 2시간 동안 유도 식작용후 남은 박테리아는 배양액으로 반복 세척하여 제거하고, 아메바는 정상 배양함으로써 미공생인 tD 아메바가 박테리아에 의해 감염되어 만들어진 실험 공생 아메바를 얻을 수 있었다. 이 실험 공생 아메바의 식포에 소수로 먹혀 들어간 박테리아는 감염 20일까지는 계속 증식하여 숙주가 수용할 수 있는 한계 (42,000 박테리아/아메바)에 달하면 그 이상 증식하지 않는다 (Ahn & Jeon, 1979).

3. 공생 박테리아 측정

실험 공생 아메바에서 박테리아의 증가, 고온 배양에서 박테리아의 손실 과정을 추적하기 위하여 아메바 한마리당 평균 박테리아 수를 측정하였다. 잘 씻은 건강한 아메바 20마리를 소수성 표면을 가진 Falcon dish cover에 옮긴 다음 배양액을 제거하고, 여기에 2 N NaOH 20 μ l를 첨가하여 아메바를 녹이던 NaOH에 건디는 세포벽을 가진 공생 박테리아만 남게 된다. 그런 다음 Petroff-Hauser 박테리아 계수기에 남아 위상차 현미경하에서 수를 측정함으로써 박테리아 수를 계승하였다 (Ahn & Jeon, 1979).

4. 이차원 전기 영동법

이차원 전기 영동법은 약간의 수정을 제외 하고는 O'Farrell (1975)의 방법을 따랐다. 등

전 쏘점 분리는 pH 3.5~10과 pH 5~8 Ampholine (LKB Instrument Inc.)을 pH 구배를 만드는 carrier로 쓰고 젤은 길이 13 cm, 내경 3 mm 유리관에 만들었다. 아메바는 TH-완충액에서 균질화 시킨 다음 초원심분리(100,000 g, 1시간) 하였다. 원심분리 후 최상층에 형성된 지방층을 제거한 상층액 단백질을 Lowry (1952) 방법에 의해 정량한 다음, lysis 완충액으로 전처리하여 각 젤에 400 μ g 정도로 적용하였다. 등전 쏘점 분리는 400 볼트에서 20시간, 최종 1시간은 800볼트에서, 전체 8,800 V·h 시행하였다. 제 2 차원 전기 영동은 두께 1.5 mm, 0.1% SDS를 함유한 8~14% 농도 구배를 가진 아크릴아마이드 평판 젤에 Laemmli (1972)의 완충액 시스템을 이용하였다.

등전 쏘점 분리한 튜브 젤을 1.5시간 equilibration 시킨 다음 SDS젤 위에 올려 1% agarose로 굳혔다. 100볼트, 15°C에서 8시간 동안 영동이 끝난 젤을 isopropyl alcohol 또는 methanol에 고정하고 Coomassie brilliant blue로 염색하거나 (Fairbanks *et al.*, 1971) 감도를 높이기 위하여 25% 2-propanol, 10% 초산에 8시간 고정하고 Merrill (1981)의 방법에 의해 silver stain하였다.

결 과

1. 두 아메바 strain간의 단백질 양상비교

재료 및 방법에 기술한 대로 2차원 전기영동한 젤을 Coomassie brilliant blue로 염색한 경우 300여개의 폴리펩타이드가 동정 가능하였으며 silver stain한 경우에는 550여개의 폴리펩타이드를 동정할 수 있었다. xD와 tD strain의 세포액 단백질 가운데 분명히 비교 가능한 주요 폴리펩타이드가 200여개 되었으며 전체적인 양상은 아래에 지적한 두 폴리펩타이드 이외에는 차이가 없었다 (Fig. 1). 20여회에 걸쳐 정상 배양한 두 아메바의 세포 단백질 양상의 비교 결과 tD strain에서 분자량 45,000, 등전점(pI) 5.9의 특이성 폴리펩타이드가 탐지되었기에 편의상 d-peptide로 명명하고 (Fig. 1A), 공생 아메바인 xD strain에서는 분자량 29,000, pI 5.5인 폴리펩타이드가 탐지되었기에 s-peptide로 명명하였다. 이상의 두 단백질의 차이는 silver stain 한 젤에서 더욱 뚜렷하였다 (Fig. 3 참조). 모든 경우에 있어서 단백질의 분자량 측정을 위하여 제 2 차원 전기영동에 분자량 표지 단백질로 heavy myosin (분자량, 200,000), bovine serum albumin (분자량, 68,000), ovalbumin (분자량, 43,000), chymotrypsinogen (분자량, 25,700), lactoglobulin (분자량 18,000)을 사용하였다.

2. 공생 특이성 단백질의 출처

두 strain의 단백질 양상이 너무나 유사하므로 공생 특이성 단백질 (s-peptide)의 출처는 우선 형태적으로 두 번이주 간에 차이를 보이는 공생 박테리아 및 공생낭과 결부 지어 보았다. 세포 기관자 (organelle)의 순수분리 방법에 의해 얻은 공생 박테리아를 담고 있는 공생낭 단백질을 전기 영동한 결과 아메바의 세포액 단백질과는 상당한 차이가 있었다 (Fig. 1과 2A 비교). 공생낭을 시료로한 젤에서도 분자량이나 등전점이 s-peptide와 유사한 단백질이 나타났다. 이 단백질과 s-peptide와의 일치 여부를 보기 위하여 200 μ g의 세포액 단백질에 동량의 공생낭 단백질을 첨가하여 전기 영동하였다. 그림 2C에서 보는 바와같이 xD 아메바 세포액에 공생낭 단백질을 첨가하여 전기영동한 경우 두개의 다른 펩타이드로 분리되지 않

고 단일 펩타이드로 나타난 점으로 보아 분자량이나 등전점이 동일함을 알 수 있고 Fig. 2에서 B와 C를 비교해 보면 동량의 공생낭 단백질에 대하여 Fig. 2C의 경우 s-peptide의 염색 밀도가 높게 나타났음은 이를 더 확실히 뒷받침해 준다. 따라서 s-peptide는 공생 박테리아를 함유한 공생낭에 주요 단백질로 존재하며 공생 아메바의 세포질에도 높은 농도로 존재함을 알 수 있다.

3. 고온 배양 효과

공생 아메바를 27°C에서 배양할 경우 7일이면 공생 박테리아가 완전 소실됨은 이미 밝혀진 바이다 (Jeon & Ahn, 1978). 박테리아의 존재 여부와 s-peptide의 존재상관을 보기 위하여 26.5°C에서 일정 기간 배양한 아메바의 세포액 단백질을 비교하였다. d와 s-peptide를 제외한 전체적인 단백질의 양상에는 두 strain간에 별 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). s-peptide는 26.5°C에서 9일 배양후에도 확인이 가능 하였으나 (Fig. 3B), 고온 배양 13일 된 xD 아메바에서는 확인이 거의 불가능하였다 (Fig. 3C). 따라서 s-peptide는 고온 배양에 의한 박테리아의 감소와 함께 소실되었다. 이에 비하여 d-peptide는 고온 배양에 아무 변화를 보이지 않았고 정상 온도에서 배양한 경우보다 더욱 뚜렷이 나타났다.

4. 실험 공생 아메바

실험 감염에 의해 유도된 실험 공생 아메바에서 박테리아의 숫적 증가와 병행하여 공생에 따른 d-peptide의 손실 또는 s-peptide의 획득 여부를 결정하기 위하여 추적하였다. 실험 공생 초기인 감염 3일에는 아메바당 공생 박테리아의 수가 5,000 내외이며 아직 전체적인 단백질 양상에는 변화가 없었고 s-peptide는 탐지가 불가능하였다 (Fig. 4A). 감염 6일 이후에는 s-peptide의 존재가 뚜렷해지며, 아메바당 박테리아 수가 20,000마리 이상인 감염 9일 정도이면 확실하여졌다 (Fig. 4B). 몇몇 실험에서 실험 공생 9일 정도면 s-peptide의 증가에 반하여 d-peptide의 농도가 감소하는 현상을 보였다 (Fig. 4A, B의 비교).

고 찰

아메바를 시료로 2차원 전기영동을 이용한 중간 또는 변이주간의 단백질 양상을 비교한 예는 아직까지 보고된 바 없고 Kates와 Goldstein (1964)이 종간의 단백질 양상을 Disc electrophoresis tube젤을 이용하여 20여개의 Coomassie blue로 염색 가능한 bands로 종간의 차이 및 유사성을 보고한 바 있다. 2차원 전기영동한 젤은 silver stain (Merril 1981)한 경우 그 감도는 Coomassie blue 염색 감도보다 월등히 높았고 해상능을 현저히 증가시킬 수 있었으며 ³⁵S-methionine으로 표지한 단백질 시료를 전기영동 후 방사사진법 (autoradiography)에 의해 얻은 결과에 전혀 손색이 없었다 (Ahn & Jeon, in preparation). 200여개의 비교 가능한 주요 펩타이드 중에 박테리아의 공생에 의해 유도된 xD strain에는 d-peptide가 손실된 반면 s-peptide를 획득한 결과를 얻었다. s-peptide는 순수 분리한 공생낭에도 존재 하였으며 고온 배양시 박테리아와 함께 소실되고 실험 공생 아메바에서 박테리아의 숫적 증가와 더불어 농도 증가를 보인 것으로 미루어 공생 박테리아와 직접 연관되어 있음을 알 수 있다. 또한 s-peptide의 증가에 반해 d-peptide의 감소 현상도 주목할 결과중의 하나이다.

이상의 결과에 의하면 s-peptide는 공생박테리아에 의해 합성되어 숙주 세포액으로 운반

되어 축적된 것으로 사료되나 그람 음성인 박테리아가 공생낭을 형성하는 막을 통과하여 s-peptide를 운반하기에는 그 기작에 있어서 상당한 난관이 있다 (Law, 1980; Pollock, 1962). 실험 감염시 새로 형성되는 공생낭에서 박테리아는 공생낭 막에서 유래된 관상 구조물에 밀착되어 있으므로 숙주 세포벽과 가깝게 접촉해 있는 것으로 미루어 운반 가능성이 전혀 배제될 수도 없다 (Ahn & Jeon, 1979). 또 다른 하나의 가능성은 xD strain에 공생 박테리아가 운반하는 두 종류의 plasmid가 있는 것으로 미루어 (Han & Jeon, 1980) 세포내에 공생하는 박테리아의 genome이 숙주로 유전자 전도된 다음 숙주 세포의 단백질 합성기작에 의해 유전자가 발현된 것일 가능성도 있다. 유기체 상호작용을 통해 유전자 전도의 가능성은 제시된 바가 있고 (Margulis, 1976), 식물에서는 잘 밝혀진 예도 있다 (Schell *et al.*, 1979). 상기 두기작에 대한 가능성은 앞으로의 연구에서 해결되어야 할 과제이며 세포내 유기체 상호작용 기작을 이해하는 중요한 열쇠가 될 것이다.

Lynn Margulis (1976)는 유전인자 및 세포 대사 생산물을 통해 유기체 상호작용이 일어나는 4가지의 가능성에 대하여 제안한 바 있다. 지금까지의 데이터를 근거로 xD 아메바에서 세포 및 공생 특이성 단백질의 세포내 기능에 관하여 다음과 같은 제안을 할 수 있다. 첫째로 xD strain의 고온 배양에 대한 감수성 (Jeon & Ahn, 1978)은 박테리아의 손실로 인한 것이라기 보다는 더 구체적으로 s-peptide의 손실 또는 d-peptide의 부재에서 오는 것일 수도 있다. 실험 감염한 아메바에서 d-peptide의 감소는 증가한 s-peptide가 그 기능을 대신하기 때문에 200세대 경과후 d-peptide gene의 손실 또는 미가역적 변화에 의하여 고온 배양시 s-peptide는 합성되지 않거나 온도 감수성으로 인한 기능상실로 인하여 xD 아메바에 고온 감수성을 부여할 수도 있다. 이는 구체적으로 실험 공생 연령에 따른 d-peptide의 완전 소실 여부 및 가역적 합성 가능성 여부를 실험 공생 아메바의 고온 감수성과 결부하여 조사하면 더 명확해 질 것이다. 둘째로, 핵이식 실험을 통해 나타난 xD 아메바 핵의 박테리아를 포함한 xD 세포질에 대한 의존도나 (Jeon & Lorch, 1976) xD와 tD strain의 변이주 특성 (Lorch & Jeon, 1981)은 s-peptide에 기인할 수 있다. 앞서 논의한 바와 같은 숙주 genome의 미가역적 변화는 숙주 핵이 s-peptide에 절대적으로 의존을 나타낼 수 밖에 없으므로 xD 아메바 핵과 tD 세포질로 조합된 세포 (xDnDc)는 공생 박테리아의 주입에 의해서만 생장이 가능하며 고온처리하였던 HnDc도 같은 의존도를 보인다. 셋째로 Jeon과 Lorch (1969, 1970)는 아메바의 변이주간에 세포핵이 가지는 치사효과 및 세포분열 저해작용은 세포 단백질에 기인한 것으로 보고한 바가 있으며 감염 초기인 실험 공생 10세대에 이르면 숙주 핵은 변이주 특이성 및 tD 아메바에 대하여 치사효과를 획득한다 (Lorch & Jeon, 1982). 따라서 실험 공생 아메바에서 감염 6일이면 탐지 가능한 s-peptide가 이에 연관되어 있을 수도 있다.

본고에서 보고한 d-peptide 및 s-peptide의 세포내 기능은 이상의 제안이 실험을 통하여 좀더 구체화 될 수 있고 궁극적인 이해는 이의 순수 분리 및 생화학적인 실험에 의해 가능할 것으로 본다.

요 약

이차원 전기영동법에 의하여 *A. proteus*의 tD strain과 tD strain이 박테리아와 공생에 의

해 유도된 xD strain의 단백질 양상을 비교하였다. Silver stain에 의해 비교 가능한 200여 개의 주요 단백질 가운데 tD strain에서 분자량 45,000, 등전점 5.9의 특이성 단백질이, xD strain의 세포액과 공생낭에서는 분자량 29,000, 등전점 5.5의 공생 특이성 단백질이 탐지되었다. 공생 특이성 단백질은 아메바 고온 배양 및 실험 공생 아메바를 이용한 실험 결과 박테리아와 직접 연관 되어 있었다. 탐지된 두 특이성 단백질에 대하여 중전의 세포 핵 이식 및 배양 실험을 통해서 얻어진 결과에 비추어 이들 단백질 상호 연관 및 세포내의 기능에 관하여 논의하였다.

REFERENCES

- Ahn, T.I. & K.W. Jeon, 1979. Growth and electron microscopic studies on an experimentally established bacterial endosymbiosis in amoeba. *J. Cell. Physiol.* **98**:49-58.
- Ahn, T.I. & K.W. Jeon, 1982. Structural and biochemical characteristics of the plasmalemma and vacuole membranes. *Exp. Cell Res.* **137**:253-268.
- Ahn, T.I. & K.W. Jeon, 1983. Strain-specific proteins of symbiotic *Amoeba proteus* detected by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Protozool. in Press*
- Armstrong, J.A. & P.D. Hart, 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observation on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* **134**:713-740.
- Brown, C.A., P. Draper & P.D. Hart, 1969. Mycobacteria and lysosomes: a paradox. *Nature* **221**:658-660.
- Dingle, J.T., 1968. Vacuoles, vesicles and lysosomes. *Br. Med. Bull.* **24**:141-145.
- Fairbanks, G., T.L. Steck, & F.H. Wallach, 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the erythrocyte membrane. *Biochem.* **10**:2606-2630.
- Goldstein, L. & C. Ko, 1976. A method for the mass culturing of large free-living amoebas. *Meth. Cell. Biol.* **13**:239-246.
- Han, J.H. & K.W. Jeon, 1980. Isolation and partial characterization of two plasmid DNAs from endosymbiotic bacteria of *Amoeba proteus*. *J. Bacteriol.* **141**:111-115.
- Jacques, P.J., 1969. Endocytosis. In: Lysosomes in biology and pathology (J.T. Dingle and H.B. Fell ed.) North Holland Publ. Co., London and Amsterdam. v. 2, 395-420.
- Jeon, K.W., 1972. Development of cellular dependence on infective organisms: Micrurgical studies in amoebas. *Science* **176**:1122-1123.
- Jeon, K.W. & T.I. Ahn, 1978. Temperature sensitivity: A cell character determined by obligate endosymbionts in amoebas. *Science* **202**:635-637.
- Jeon, K.W. & J.C. Hah, 1977. Effect of chloramphenicol on bacterial endosymbionts in a strain of *Amoeba proteus*. *J. Protozool.* **24**:289-293.
- Jeon, K.W. & M.S. Jeon, 1975. Cytoplasmic filaments and cellular wound healing in *Amoeba proteus*. *J. Cell. Biol.* **67**:243-249.
- Jeon, K.W. & M.S. Jeon, 1976. Endosymbiosis in amoebae: Recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J. Cell. Physiol.* **89**:337-344.
- Jeon, K.W. & I.J. Lorch, 1967. Unusual intra-cellular bacterial infection in large free living amoebae. *Exp. Cell Res.* **48**:236-240.
- Jeon, K.W. & I.J. Lorch, 1969. Lethal effect of heterologous nuclei in amoeba heterokaryons.

- Exp. Cell Res* 56: 233-238.
- Jeon, K.W. & I.J. Lorch, 1970. Strain-specific mitotic inhibition in large mononucleate amoebae. *J. Cell. Physiol.* 75:193-198.
- Jones, T.C. & J.G. Hirsch, 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 136:1173-1194.
- Kates, J.R. & L. Goldstein, 1964. A comparison of the protein composition of three species of amoebae. *J. Protozool.* 11:30-35.
- Kimball, J.W., 1978. Biology 4th Ed. Addison-Wesley Pub. Co. p.790.
- Laemmli, U.K., 1972. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Law, B.A., 1980. Transport and utilization of proteins by bacteria. In: Microorganisms and Nitrogen Sources (Ed. by J.W. Payne). John Wiley & Sons Ltd. pp. 381-409.
- Lorch, I.J. & K.W. Jeon, 1980 Resuscitation of amoebae deprived of essential symbiotes: Micrurgical studies. *J. Protozool.* 27:423-426.
- Lorch, I.J. & K.W. Jeon, 1981. Rapid induction of cellular strain specificity by newly acquired cytoplasmic components in amoebas. *Science* 211:949-951.
- Lorch, I.J. & K.W. Jeon, 1982. Nuclear lethal effect and nucleocytoplasmic incompatibility induced by endosymbionts in *Amoeba proteus*. *J. Protozool.* 29:468-470.
- Lowry, O.L., N.J. Rousebrough, A.L. Farr, & R.J. Randell, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Margulis, L., 1976. A review: Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Exp. Parasitol.* 39:277-349.
- Merril, C.R., 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211:1437-1438.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Pollock, M.R., 1962. Enzymes. In: The bacteria (Gunsalus, I.C. and Stanier R.Y. editors). Academic Press. 4:121-178.
- Schell, J. *et al.*, 1979. Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 204:251-266.
- Silverstein, S.C., R.M. Steinman & Z.A. Cohn, 1977. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:669-722.
- Taylor, F.J.R., 1974. Implication and extension of the serial endosymbiosis theory of the origin of eukaryotes. *Taxon* 23:229-258.

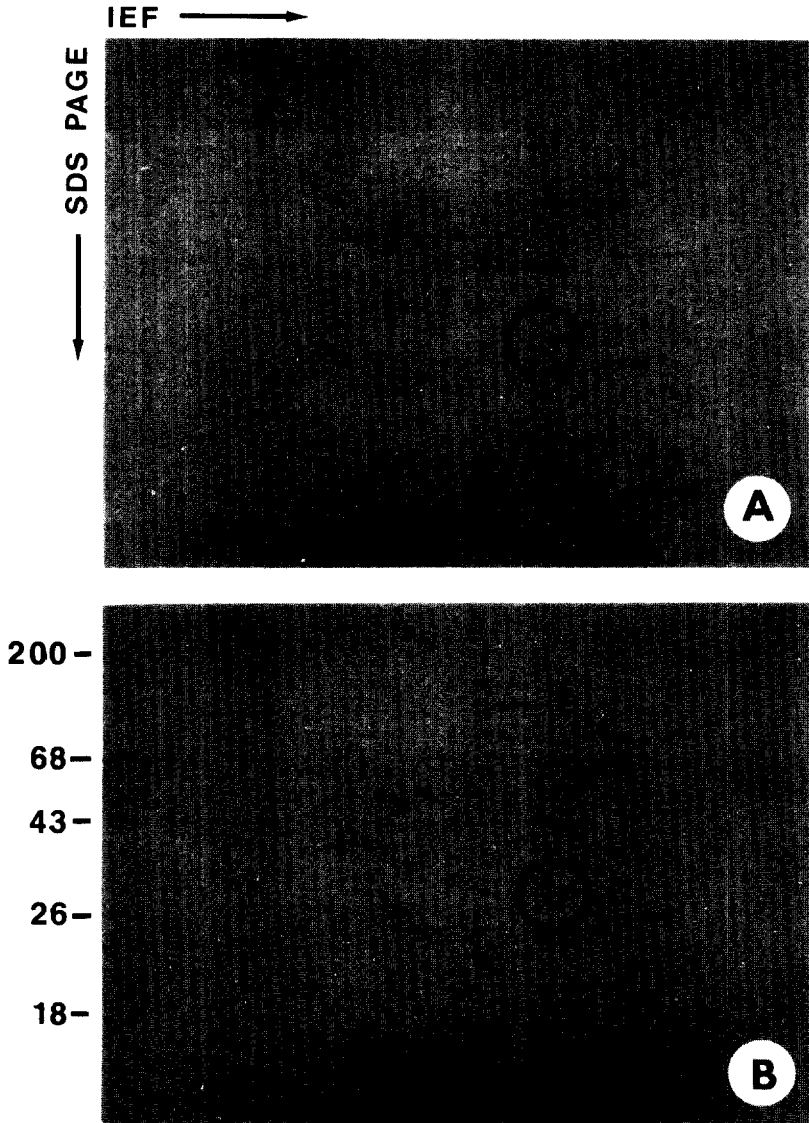


Fig. 1. Two-dimensional electrophoretic patterns of tD-amoeba cytosol proteins (A) and of xD-amoeba cytosol proteins (B), after staining with Coomassie brilliant blue. Note the presence of one tD cell specific peptide (d arrow) in A. Also note the presence of one xD cell specific peptide (s) inside the circle in B.

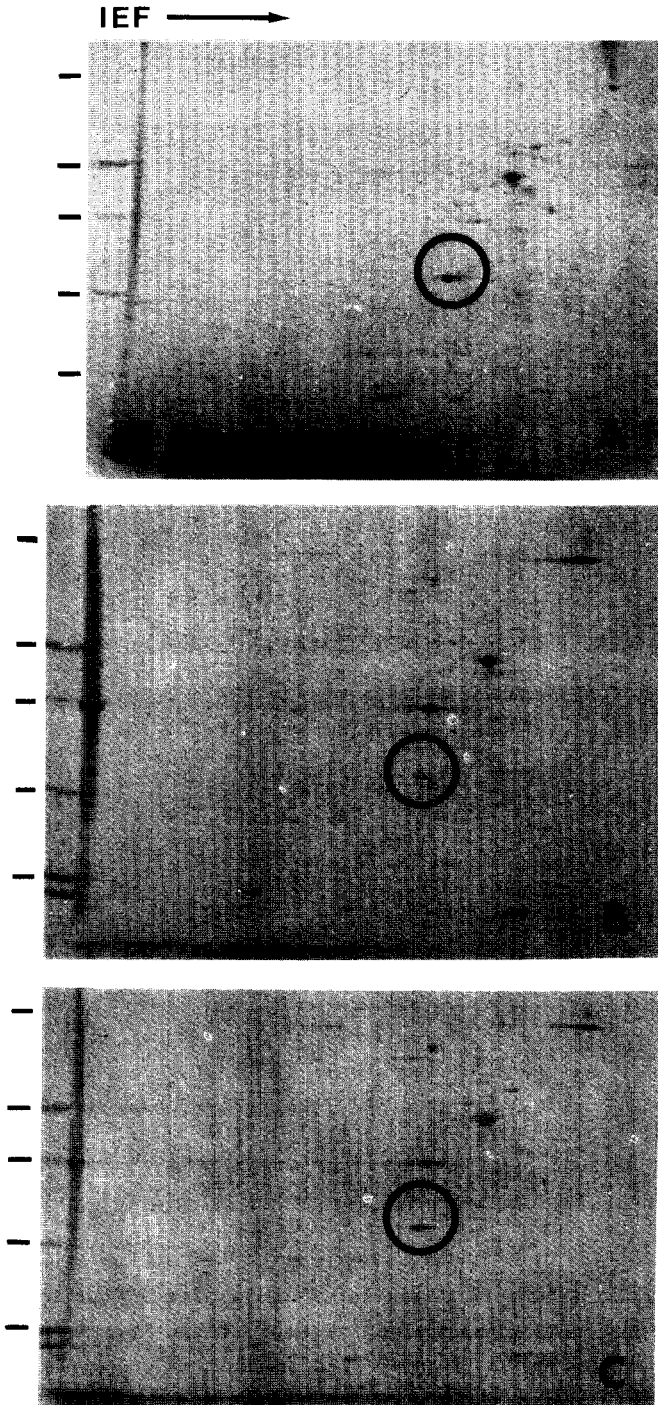


Fig. 2. Two-dimensional electrophoretic patterns of amoebacytosol proteins mixed with equal amount of symbiotic vesicle proteins. Gels were restained with Coomassie brilliant blue. A, purified symbiotic vesicle (SV); B, tD-amoeba cytosol + SV; C, xD-amoeba cytosol + SV. Note the prominent s-peptide like protein shown in A. Also note and compare the stained intensity of the equivalent peptides in B and C.

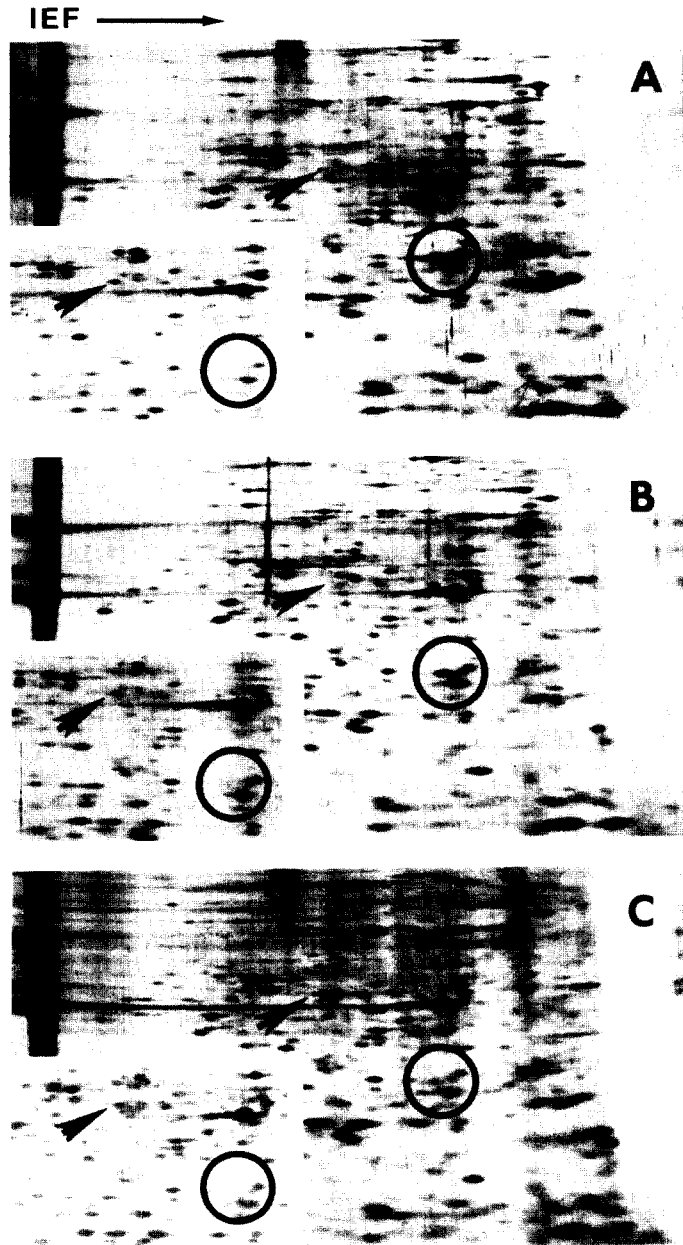


Fig. 3. Selected areas of two-dimensional electrophoretic gels of proteins from xD amoeba cultured at 26.5°C for 3 days (A), 9 days (B), and 13 days (C). Protein patterns of simultaneously treated tD amoeba are shown as inset for comparison. Note the change in silver-stained density of the s-peptide in the circled area of xD. Also note the presence of d-peptide (arrow) in tD amoeba (inset) that is not detectable in xD.

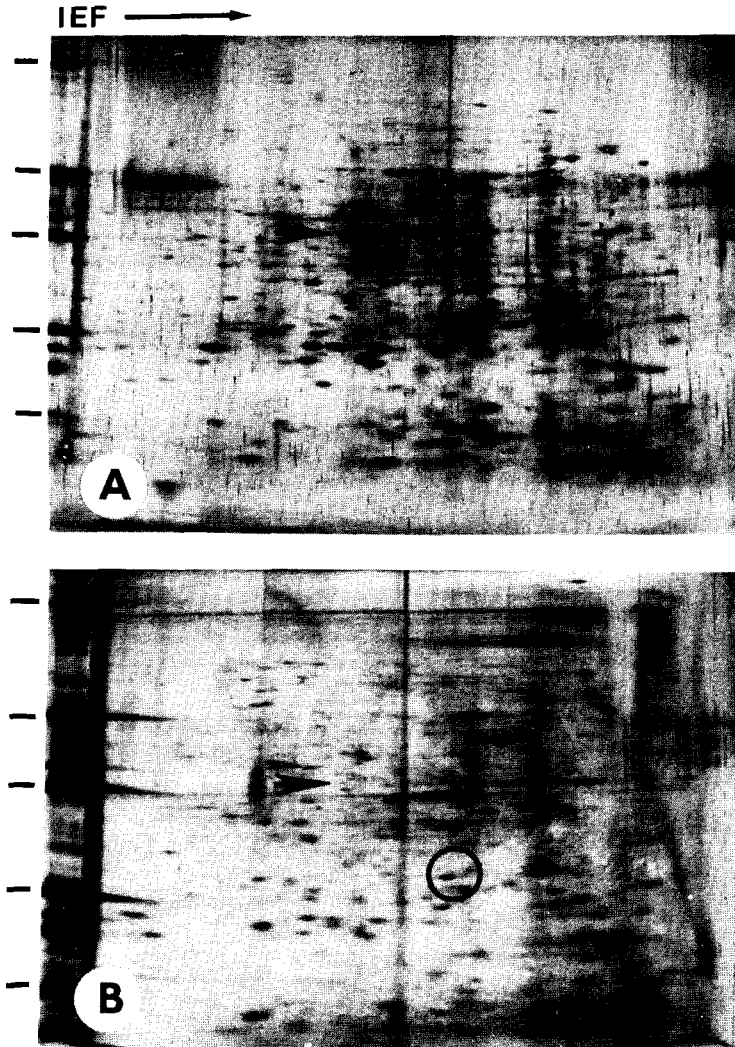


Fig. 4. Selected areas of two-dimensional electrophoretic gels of proteins from experimentally established symbiotic amoeba. A, 3 days of symbiosis; B, 9 days of symbiosis. The number of bacteria present in each amoeba was 4,800 and 24,000 in 3 days and 9 days of symbiosis respectively. Note the change in silver-stained density of s-peptide.