

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	: 探討RACK1在細胞外的功能性分析
------------	---------------------

執行計畫學生：黃瀟瑩
學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-046-B
研究期間：106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授：蔡振寧

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 107年05月28日

摘要

RACK1 是一個在真核細胞中廣泛表現的蛋白質，可以透過結合許多不同的蛋白質來促進或抑制結合蛋白的生物活性。在真核生物中，WNT 訊息傳遞對於細胞分化與恆定扮演著重要的角色。在過度表現典型 WNT 配體 WNT3a 的細胞培養基中，利用免疫沉澱可以偵測到細胞外 RACK1 蛋白質質量的上升，而在表現非典型 WNT 配體 WNT5a 的細胞培養基中就沒有這樣變化。有趣的是將 GSK3 抑制劑加入細胞中以活化 WNT 訊息傳遞活性，並無法偵測到培養基中 RACK1 蛋白質質量有所變化。除此之外，由 RACK1 免疫沉澱上清液中分離出胞外體，其中可以偵測出 RACK1 蛋白質。將表現 WNT3a 的細胞加入抑制胞外體釋放的試劑 GW4869，結果發現釋放出來的胞外體的確會下降，而其中所含 RACK1 也跟著減少。綜合以上的結果顯示 RACK1 在 HEK293T 細胞外有存在二部分，一部分是游離的，而另一部份是包含在胞外體中，但含量較少。免疫沉澱分析結果顯示 WNT3a 表現的細胞培養液，與 RACK1 結合的 PP2A-C α / β 與 GSK3 β 量，都比控制組有明顯上升的現象。

關鍵字

WNT3a、RACK1、exosome

前言

WNT 訊息傳遞

WNT 是一群與細胞增生、分化有關的分泌型醣蛋白家族，根據 β -catenin 是否參與活化可分類為典型 WNT 傳遞路徑 (canonical Wnt pathway) 及非典型 WNT 訊息傳遞路徑 (non-canonical Wnt pathway)。在典型路徑中，若 WNT 訊息傳遞尚未開啟，細胞質內的 β -catenin 會被 axin、APC 及 GSK-3 β 等蛋白複合物 (destruction complex) 結合，GSK-3 β 使 β -catenin 磷酸化，磷酸化的 β -catenin 會被泛素連接酶 (ubiquitin ligase) 接上泛素 (ubiquitin)，最後送至 Proteasome 被分解 (ubiquitin-dependent protein degradation)，此時細胞質中的 β -catenin 處於低濃度的狀態，因此 WNT signaling 無法被開啟。當 WNT ligand 結合至膜上受體 Frizzled (FZD) 及 LRP5/6，會活化下游蛋白 Dishevelled，而促使 destruction complex 被分離，最後抑制 β -catenin 被磷酸化的過程，增加其穩定性及細胞質中的濃度，促使 β -catenin 進入細胞核中和轉錄因子 TCF/LEF 結合，開啟下游的基因 (例如：*Myc*、*cyclin D*、*FGF*...)，這些下游基因大多與細胞增生相關。在非典型路徑中，WNT ligand 只需要與 Frizzled receptor 結合，而不需要 LRP5/6 receptor，結合後 Frizzled receptor 可能會開啟兩個下游的訊息傳遞，如果活化 small GTPases (RhoA and Rac1)，稱為 WNT/PCP pathway；如果調控 Ca^{2+} 離子濃度，則稱為 WNT/ Ca^{2+} pathway。另外，WNT 家族也可分為 WNT1 與 WNT5a 兩大類，Wnt1 類別包含 WNT1、WNT2、WNT2b、WNT3、WNT3a 等，屬於典型路徑；WNT5a 類別則包含 WNT4、WNT5a、及 WNT11，屬於非典型路徑 (Nusse and Clevers, 2017)。有研究指出 R-spondin 可增強 WNT 訊息傳遞的活性，R-spondin 是一個於 2004 年才發現的分泌性蛋白質的家族，或簡稱為 RSPO，到目前為止，在哺乳類中 RSPO 更可分為由 4 個不同的成員所組成，並命名為 RSPO1-4，其中，RSPO 會與其細胞膜上 LGR4/5 與 ZNRF3 或 RNF43 泛素連接酶 (ubiquitin ligase) 結合，進而穩定細胞膜上 WNT 受體

Frizzled 和 LRP5/6，最後達到增強 WNT/ β -catenin 訊息傳遞的活性 (de Lau et al., 2014)。

RACK1 (Receptor for Activated C kinase 1)

RACK1 是一個分子量 32 kDa 的支架蛋白 (scaffold protein)，在人類基因細胞中是由 *GNB2L1* (*guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*) 所表現。它含有七個串連的單元，每個單元均含有大量 Tryptophan 及 Aspartic acid，因此稱為 WD 的重複單元 (WD repeats)；立體結構顯示它形成七個葉片狀螺旋槳結構，每一個葉片結構都可能跟其他蛋白產生結合，結合後可運送該蛋白至細胞內特定位置並穩定其活性，它也和多種膜上受體、核內蛋白、核糖體等相互作用 (Adams et al., 2011)，因此 RACK1 是許多訊息傳遞路徑的重要調控者，可影響細胞的許多功能，目前已知有 80 多種蛋白可與 RACK1 結合，包括 protein kinase C、Src kinase、protein phosphatase 1A (PP1A)、protein phosphatase 2A (PP2A) 及 GSK-3 β 等 (Duff et al., 2017)。

Exosome

Exosome (胞外體) 是主要起源於 endosomes 的細胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs)，直徑約在 30 - 120 nm 間。它存在於許多生物體液中，包括血液、尿液和細胞培養基等，幾乎所有的動物細胞都會分泌胞外體，其中可偵測到蛋白質、脂肪、mRNA 及 miRNA 等分子，在細胞間訊息傳遞扮演著重要角色，胞外體不只調控了一般的細胞功能，也參與許多疾病、癌症的發生 (Colombo et al., 2014)。

研究動機

我們實驗室之前在研究 RSPO1 蛋白質的醣化現象與其分泌效率之間的相

關性，結果發現除了會發生 N-連接醣化的修飾外 (Chang et al., 2016)，尚可產生 O-連接醣化。利用 GalNAc 的類似物來標示表現 RSPO1 的細胞，結果發現除了 RSPO1 以外，尚有許多 O-連接醣化蛋白會出現在表現 RSPO1 的細胞外，利用質譜儀的分析，我們發現其中含有 RACK1，長久以來 RACK1 的研究重心多放在細胞內的角色，幾乎沒有涉及它在細胞外的作用。因此接下來實驗使用免疫沉澱法並配合分離胞外體的方式、去分析過度表現 WNT3a 細胞外 RACK1 的變化以及 RACK1 在胞外可與哪些重要訊息蛋白產生作用。

材料與方法

質體分離

使用 Plasmid MiniprepPlus Purification Kit (GeneMark) 來分離出表現載體，操作步驟如下：將隔夜培養的 25 ml 細菌培養液以 7,000 - 8,000 x g 在 4 °C 離心 10 分鐘，丟棄上清液，加入 400 µl Solution I (含有 RNase A) 至剩下的細菌沉澱物 (pellet) 中，以 Vortex mixer 震盪至完全懸浮，再加入 400 µl Solution II 輕輕地上下翻轉離心管 3 - 5 次混和來完全溶解細菌，最後加入 400 µl Solution III，同前一步驟混和均勻，然後以 7,000 - 8,000 x g 在 4 °C 離心 5 分鐘，接下來將澄清的上清液移至裝有 Spin column 的 Collection tube 中，以 13,000 rpm 離心一分鐘，丟棄濾液，加入 500 µl Endotoxin removal wash solution (含有 Isopropanol)，靜置 2 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄濾液，加入 700 µl Wash solution (含有 ethanol)，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄濾液，然後將此清洗步驟重複一次，最後再以 13,000 rpm 離心 7 分鐘來去除殘餘的酒精。然後將 spin column 轉移至新的 1.5 ml 離心管，加入 30 µl Elution solution，靜置 2 分鐘，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將 DNA 質體沖洗至離心管中。接下來配製 DNA 質體的 50 倍稀釋液，利用光譜儀定量在波長 260 nm 及 280 nm 時的吸光值，由此可計算出 DNA 的濃度及純度，最後將 DNA 質體分裝儲存於 -20 °C 冰箱中。

細胞培養

所有實驗所使用的細胞為 human embryonic kidney cell (HEK293T)，培養於 10 公分培養皿 (Greiner, CELLSTAR®) 中，培養箱環境為 37 °C、5% CO₂，其培養液為 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Life Technologies)，含有 10% Fetal bovineserum (FBS, Hyclone Inc.)，及 1% Penicillin/Streptomycin (PS, Thermo Fisher)，每二到三天、細胞密度達到 90% 時繼代培養一次。細胞繼代培養操作步驟如下：沿壁吸取舊培養基並將其丟棄，以 2 ml 無菌

Phosphate-buffered saline (PBS, KCl、KH₂PO₄、NaCl、Na₂HPO₄) 清洗後，以 900 μ l PBS 稀釋 100 μ l 10 x Trypsin-EDTA (TE, Biological Industries)，將 TE 加入培養皿中，潤洗細胞後將 TE 吸起來丟棄，然後放回 5% CO₂、37 °C 的培養箱反應 2 到 3 分鐘，使附著之細胞自盤壁脫落後，加入 2 ml 10% FBS/DMEM 並將細胞混和均勻，取 200 - 250 μ l 加至新的培養皿中（已含 10 ml 10% FBS/DMEM，搖均勻後再放回 5% CO₂、37 °C 的培養箱培養。若要冰凍細胞以長期保存，則需配製冷凍保存溶液（1 ml 10% FBS/DMEM 加入 100 μ l Dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco)，將密度約長至 80 - 90% 的 10 公分培養皿，依繼代培養步驟將細胞混合均勻至 2 ml 10% FBS/DMEM 中，再放入 15 ml 離心管以 1,000 rpm 離心 5 分鐘，將其上清液丟棄，再加入 2 ml 冷凍保存溶液混勻，分裝至冷凍小管中，每管可分裝 1 ml，然後依序降溫（室溫 20 分鐘；4 °C 20 分鐘；-20 °C 20 分鐘；-80 °C 隔夜），隔日再放入液態氮桶內保存。

細胞轉染

使用 HEK293T 作為基因表現的細胞株，當 10 公分培養皿中的細胞密度達到 80 - 90% 時即可進行 Seeding，依繼代培養的方法將細胞混合均勻至 2 ml 10% FBS/DMEM 中，取 350 - 400 μ l 種入新的培養基中，使其細胞密度為 30 - 40%，於 37 °C、5% CO₂ 環境下培養 24 小時後細胞密度達到 70 - 80%，即可進行轉染。轉染方法如下：沿壁吸取舊培養基並將其丟棄，分別以 5 ml、10 ml、10 ml PBS 清洗三次，加入 10 ml Opti-medium (Gibco Life Technologies, 含有 2% exosome-free FBS)，放回 5% CO₂、37 °C 的培養箱培養至少 30 分鐘。接著配製適當濃度 DNA 溶液，將 600 μ l DMEM (serum-free) 及 ddH₂O 加至 1.5 ml 離心管中，再加入 20 μ l DNA (含 5 μ g DNA)，利用震盪器輕輕混和及離心一下，再加入 20 μ l Non-liposomal Transfection reagent II (T-Pro Biotechnology)，以同樣方式混和並離心，於室溫靜置 15 分鐘以上，最後將配製好的 DNA 溶液（約 640 μ l）

緩緩滴入 10 公分培養基中，輕輕搖晃培養皿數下使 DNA 分布均勻，再放回培養箱中培養 48 小時，然後收集細胞培養液及溶解液。

細胞培養液及溶解液收集

取出培養皿，將細胞培養液 (conditioned media) 收集於 15 ml 離心管中，置於冰上，然後加入 10 ml PBS 至培養皿中，洗去懸浮的細胞，再加入 1 ml 含有蛋白酶抑制劑 (Complete™, Roche) 的細胞溶解試劑 (RIPA lysis buffer, Amresco)，使用細胞刮刀 (cell scraper) 將細胞刮落後，吸取細胞溶解物 (cell lysate) 至 1.5 ml 離心管中，並置於冰上，然後使用超音波震盪器 (Sonicator S-4000, Misonix) 使細胞破碎，設定條件是：Amplitude 100、每 30 秒休息 15 秒、實際震盪時間 10 分鐘。接下來將細胞培養液 (media) 及細胞溶解物 (cell lysate) 以 14,000 rpm 在 4 °C 下離心 10 分鐘以去除細胞碎片 (cell debris)，將其上清液移至新的離心管中。取 100 µl 細胞培養液 (media) 加入適量蛋白酶抑制劑 (Complete™)、33.3 µl 4 x Sample buffer (240 mM Tris-HCl, pH 6.8、8% SDS、40% Glycerol、5% β-mercaptoethanol、0.04% Bromophenol Blue)；然後取 30 µl 細胞溶解物 (cell lysate)，加入 10 µl 4 x Sample buffer，混合均勻後，以沸水加熱 5 分鐘，即可用 Western blot 做進一步分析，或儲存於 -20 °C 冰箱。

免疫沉澱

將欲分析的細胞溶解物 (cell lysate) 或細胞培養液 (media)，依照下面的配方加入試劑：100 µl 細胞溶解物 (含 250 µg 蛋白質)，加入 900 µl 蛋白酶抑制劑 (Complete™, Roche) 的 PBS，細胞培養液則先使用 Microsep Centrifugal Device (Pall, cutoff 3 kDa) 離心濃縮，將 10 ml 培養液濃縮至 0.5 ml，然後取 0.5 ml 濃縮細胞培養液加入 0.5 ml 上述的混合液，再加入 20 µl 已經用 PBS 平衡過的 Protein L Agarose (Santa Cruz Biotech)，在 4 °C 下旋轉反應一小時，進行

Pre-clearing 的步驟，以去除非專一性結合至 Protein L agarose 上的蛋白質。反應完後，離心將上清液轉至另一個試管中，丟棄樹脂，然後加入 0.5 µg anti-RACK1 (BD Bioscience, IgM)，在 4 °C 下旋轉反應一個晚上。隔天，加入 20 µl 已經用 PBS 平衡過的 Protein L Agarose，在 4 °C 下旋轉反應一小時，離心後丟棄其上清液，用 0.5% Nonidet P40/PBS (0.5% NP40/PBS) 清洗 3 次，每次 3 分鐘，然後再離心並丟棄其上清液，加入 30 µl 1 x sample buffer，用沸騰的水加熱 5 分鐘後，收及其上清液，即可用 Western blot 做進一步分析，或儲存於 -80 °C 冰箱。

Exosome 分離方式

主要使用 size exclusion chromatography 方式，使用 qEV (Izon, Inc. exclusion limit 70 nm) 將胞外體與其他蛋白質分開 (Böing et al., 2014)。方法簡述如下，收集細胞培養液 (至少 10 ml 以上) 至一個乾淨 50 mL 離心管，首先離心 (1000 x g, 4°C, 10 分鐘) 去除懸浮細胞，然後再將上清液吸取到另一個乾淨 50 mL 離心管，然後再次離心 (16,000 x g, 4°C, 30 分鐘) 來去除細胞殘渣 (cell debris)，最後將培養基上清液先以 0.2 µm 過濾器 (Acrodisc® Syringe Filter, Pall Inc.) 過濾去除 200 nm 以上粒子，然後再使用離心濃縮管 (Microsep™, centrifugal device, cutoff MW 3 kDa, Pall)，濃縮至體積約 0.5 ml。接下來將 qEV 管柱 (內含 10 ml resin) 加入 30 ml PBS，以地心引力自然流出，丟棄下方的液體。當管柱表面已經沒有液體覆蓋時，將 0.5 ml 濃縮 media 小心地加入管柱上方，接下來再持續加入適量 PBS，以地心引力自然流出；當上方開始加入濃縮 media 時，下方隨即以每管 0.5 ml 方式收集，最後收集第 8 管至第 10 管，將這些管內所含液體，以濃縮離心管濃縮至大約 100 -200 µl，然後加入 1/10 體積的 250 mM trehalose/PBS，使 exosome 最後處於 25 mM trehalose/PBS 溶液，來保護 exosome 形態並避免其聚集 (Bosch et al., 2016)，最後將此 exosome 溶液貯存在 -80°C 或進行後續各種分析。

蛋白質定量

採用 Bradford 蛋白定量法，主要原理是在酸性溶液中，若 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 與蛋白質結合，溶液顏色會由紅棕色 (波長 470 nm) 轉變成灰藍色 (波長 595 nm)，並以 Bovine serum albumin (BSA, Sigma) 當作標準品，其形成的複合物在溶液中可以維持穩定約 30 - 60 分鐘。測定方法如下：使用 96 well plate，每個 well 先加入 200 μ l CBG (Bio-Rad)，再加入 10 μ l BSA 標準品 (濃度分別為 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml) 或稀釋 10 倍的細胞溶解物 (cell lysate)，混和均勻並去除氣泡，在避光環境下反應至少 5 分鐘，以 ELISA reader 測量在波長 595 nm 時的吸光值，然後利用已知濃度的標準品作出標準曲線，計算出待測檢體中的蛋白濃度。

西方墨點法 (Western blot)

使用 Bio-Rad 電泳系統執行 SDS-PAGE gel，配置 12% SDS-PAGE gel，將 3 μ l protein ladder (Bio-Rad)、10 μ g 處理過的變性蛋白加入 well 中，電源供應器設定為 stacking gel：固定電壓 60 伏特，約進行 50 分鐘；separation gel：固定電壓 80 伏特，約進行 120 分鐘。接下來使用 Mini Trans-blot module (Bio-Rad)，先將 PVDF 膜 (Pall, Inc) 置於甲醇中活化，將 PVDF 膜與 separating gel 相覆蓋，避免中間有氣泡，然後再各以三張已浸濕於 Towbin's transfer buffer (25 mM Tris-base、192 mM Glycine、20% methanol, pH 8.3) 的濾紙 (Whatman No.1) 包圍，外面再放置海綿，夾在 transfer cassette 中，然後將 transfer cassette 立刻置於已加 transfer buffer 的 transfer tank 中，使 PVDF 膜的面朝向在正極，separating gel 的面朝向負極，並在 transfer tank 外加入冰和水，確保 buffer 在轉漬過程中能即時冷卻，接下來以固定電流 350 mA 進行 120 - 140 分鐘。轉漬完成後，先將 PVDF 膜浸至 ddH₂O 以洗去甲醇，加入 BlockPRO™ blocking buffer (Visual Protein)，置於 30 -50 rpm 的 shaker 上室溫反應 1 小時，再加入含

有適當稀釋的一級抗體 (置於 5 % skim milk/PBST), 於 30 - 50 rpm 的 shaker 上、4 °C 反應隔夜。隔天, 再以 PBST (含有 0.1% Tween 20 的 PBS) 清洗 6 次, 每次 5 分鐘。接下來加入含有 anti-mouse 或 anti-rabbit peroxidase 的二級抗體 (1 : 3000), 置於 30 - 50 rpm 的 shaker 上室溫反應 1 小時後, 再以 PBST 清洗 6 次, 即可用化學冷光法 Enhanced chemiluminescence (ECL) 呈色, 使用 Image Quant™ LAS 4000 (GE Health) 冷光影像偵測儀偵測訊號, 得到的數據利用 Image J 或 Multi Gauge (Version 2.2) 等軟體做訊號定量及分子量分析。若欲繼續分析其他蛋白質, 則在冷光呈色後以 PBST 清洗 3 次, 將 PVD 膜浸至 T-Pro Wetern Blot Stripping Reagent (T-Pro Biotechnology) 中, 於 30 - 50 rpm 的 shaker 上室溫反應 6 - 10 分鐘, 再以 PBST 清洗 3 次, 加入 Block PRO™ blocking buffer, 於 30 - 50 rpm 的 shaker 上室溫反應 1 小時, 然後再加入其他適當稀釋的一級抗體, 重覆以上步驟。使用的抗體是 anti-RACK1 (BD Bioscience, 1:2000)、anti-WNT3a (Genetex, 1:2000)、anti-WNT5a (Genetex, 1:1000)、anti-β-catenin (BD Bioscience, 1:3000)、anti-α-tubulin (Novus DM1A, 1:3000)、anti-CD63 (ProteinTech, 1:2000)、anti-CD81(SCBT, 1:2000)、anti-calnexin (Genetex, 1:1000) 及 anti-Alix (ProteinTech, 1:2000)。

穿透式電子顯微鏡 (Transmission electronic microscopy)

分析的檢體首先放在 Grid 上, 約一分鐘後, 以二次水清洗二次, 然後以 2% uranyl acetate 染色約 40 秒, 最後以穿透式電子顯微鏡 (HT7700, Hitachi, Inc.) 來觀察它們的大小與型態。

結果與討論

表現典型路徑的 WNT3a ligand 時，細胞外 RACK1 的分泌量會增加

首先分別將 vector、WNT3a 分別轉染至 HK293T 細胞株，然後收集細胞溶解液與胞外培養液，並使用培養液進行 RACK1 的免疫沉澱分析。WNT3 屬於典型 WNT 路徑的 ligand，細胞表現 WNT3a，可分泌到細胞外培養基中（圖 1B），並以 autocrine 方式，刺激 WNT 訊息傳遞的活性，使其下游 β -catenin 在細胞內的累積量增加（圖 1A），進而活化下游的目標基因表現。結果發現，細胞表現 WNT3a 時，免疫沉澱結果顯示，細胞外的 RACK1 有顯著的上升（圖 1C），上升幅度大約為 3 倍（圖 1D）。RSPO1 可以穩定細胞上的 Frizzled 及 LRP5/6 受體，使的有自體分泌 WNT ligand 的 HEK293T 細胞，可因此增加其細胞內部 WNT 訊息傳遞活性（de Lau et al., 2014）。細胞表現 RSPO1 時，細胞外的 RACK1 也有顯著的上升（資料未顯示），除此之外，表現非典型路徑的 WNT5a ligand（圖 2A），細胞外的 RACK1 的量並沒有增加（圖 2B）。有趣的是，當加入 GSK3 抑制劑（6-Bromoindirubin-3'-oxim，簡稱 BIO），來活化典型 WNT 訊息傳遞的活性時（圖 2A），細胞外 RACK1 的量也沒有明顯的變化（圖 2B）。上述結果顯示表現典型 WNT ligand WNT3a 可增加細胞外 RACK1 的量，而活化下游 WNT 活性對細胞外 RACK1 量並沒有影響。

有部分的胞外 RACK1 存在於胞外體中

RACK1 蛋白本身並沒有具備典型的訊息肽結構（signal peptide），那麼 RACK1 到底是如何出現在細胞外的呢？之前的研究指出，果蠅的 S2 細胞培養液會分泌出含有 Wiggless (WNT 的同源蛋白) 的胞外體 (exosome)，其中含有 RACK1 蛋白的成分 (Beckett et al., 2013)。前面培養基中 RACK1 免疫沉澱的部分，並沒有胞外體的標誌蛋白 Alix 的訊號（資料未顯示），表示上述 RACK1 免疫沉澱並沒有包含胞外體的部分。為了瞭解 RACK1 是否可以透過胞外體方式分

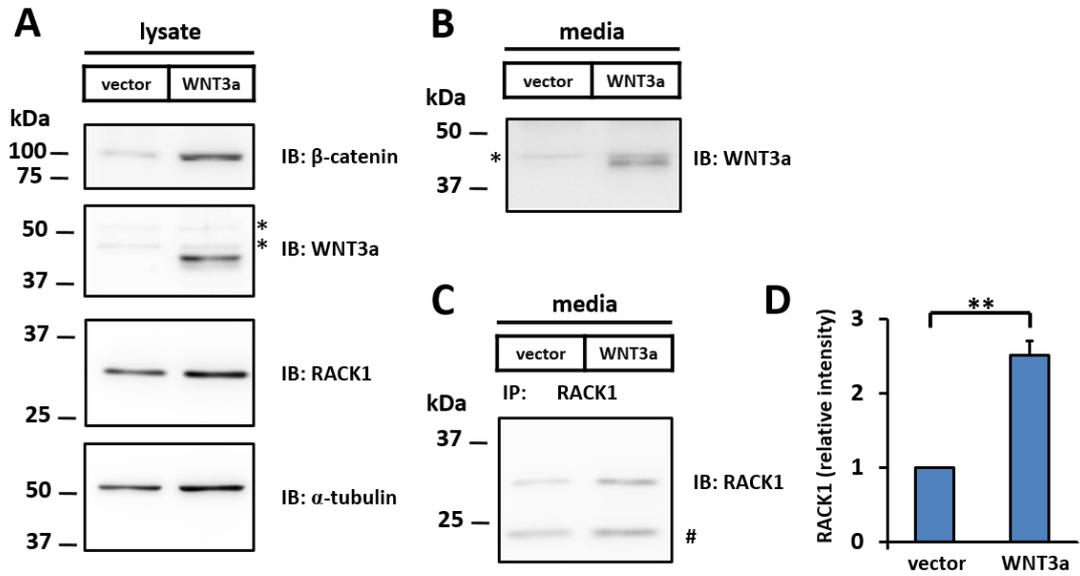
泌至細胞外，因此將 RACK1 免疫沉澱的上清液取出，利用分子篩層析法 (Size exclusion chromatography) 分離出胞外體部分，這種胞外體的部分經過 Western Blot 分析，含有典型的胞外體標誌蛋白 CD63 及 Alix (圖 3C)，也幾乎不含有內質網的標誌蛋白 Calnexin (圖 3C)，顯示分離出胞外體的純度很高。以穿透式電子顯微鏡來觀察，分離出的胞外體大小約在 30-80 nm 之間，並呈現典型的杯子形(cup-shaped) (圖 4)。在表現 WNT3a 的胞外體部分可以偵測到 RACK1 的存在 (圖 3C)。為了要進一步證明 RACK1 存在於胞外體，在表現 WNT3a 的細胞中加入了胞外體的釋放抑制劑 GW4869 (Kosaka et al., 2010; Yuyama et al., 2012)，結果發現加入 GW4869 並不會影響免疫沉澱中 RACK1 的含量 (圖 3B)，但分離出胞外體的 CD63 及 Alix 的訊號明顯下降 (圖 3C)，表示在表現 WNT3a 的細胞中加入 GW4869 的確會降低胞外體釋出的量，而 RACK1 的量也會因為加入 GW4869 而跟著下降 (圖 3C)，上述的實驗結果證明了至少有一部份 RACK1 是包含在胞外體中。

為了進一步確認上述結果，將表現 RSPO1 細胞的培養液經層析分離的各沖提部份(elution profiles)，進行 Western blot 分析。結果發現自第 8 管起有明顯胞外體標誌(CD63 及 CD81)的訊號；但是第 11 管開始，CD63 部分有分子量約為 67 kDa 的明顯非專一性訊號，顯示由此初開始即出現胎牛血清蛋白(fetal bovine serum)。因此接下來將第 8 管至第 10 管部份收集，作為後續胞外體部分的分析檢體(圖 5 第一行及第二行)。除此之外，也發現有少部分 RACK1 可表現在胞外體部分，大部分則是在粒子大小較小的非胞外體部分，表現的 RSPO1-myc 則不會出現在胞外體部分(圖 5 第三行及第四行)。這個實驗結果，確認了會有少部分的 RACK1 出現在胞外體部分。

細胞外 RACK1 可與訊息調節分子交互作用。

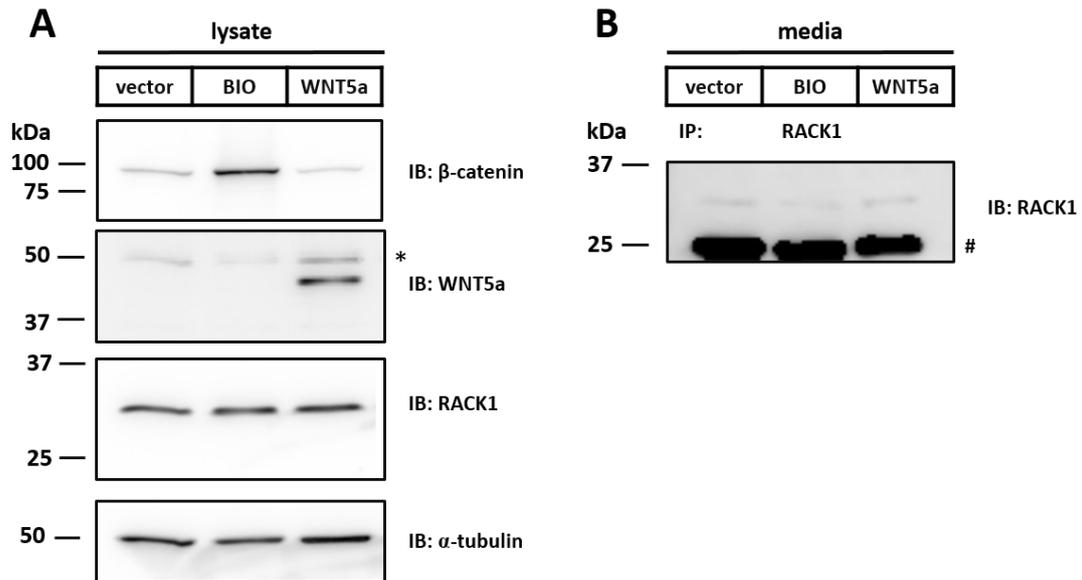
由於細胞外的 RACK1 在 WNT3a 表現的細胞培養液中，有明顯上升，因此接下來使用免疫沉澱分析細胞培養液中 RACK1 與一些訊息調節分子之間的變化，

結果發現在 WNT3a 表現的細胞培養液，與 RACK1 結合的 PP2A-C α / β 與 GSK3 β 量，都比控制組有明顯上升的現象；而 PP1A-C α 量就比較沒有明顯變化（圖 6）。為了進一步確認 RACK1 是否存在於胞外體中，接下來將會利用免疫染色及電子顯微鏡來標示胞外體中的 RACK1。除此之外也會將表現 WNT3a 或 RSPO1 的培養液或胞外體部分加入細胞，觀察接受細胞中的 WNT 訊息傳遞與運動性的變化，因為 RACK1 在胞外也有結合 PP2A，接受細胞的胞內蛋白質的 serine 與 threonine 磷酸化變化也將一併觀察。



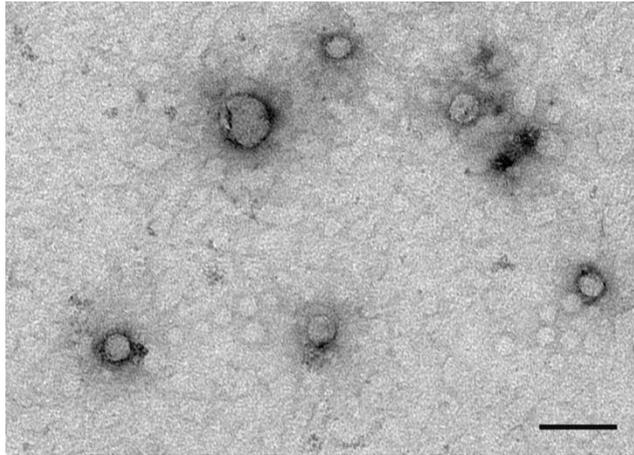
圖一、RACK1 在表現典型 WNT3a 時細胞培養基中的變化。

(A) 表現典型 WNT3a 的細胞溶解物中的蛋白質分析。(B) 表現典型 WNT3a 的培養基中 WNT3a 的分析。*代表非專一性的訊號 (A、B)。(C) 表現典型 WNT3a 的培養基以免疫沉澱分析其中 RACK1 的量。(D)為三重複實驗定量後的比較圖，統計分析法為 Student's t 檢定，** $t < 0.01$ ；#代表免疫沉澱中所使用抗體的 light chain 訊號。



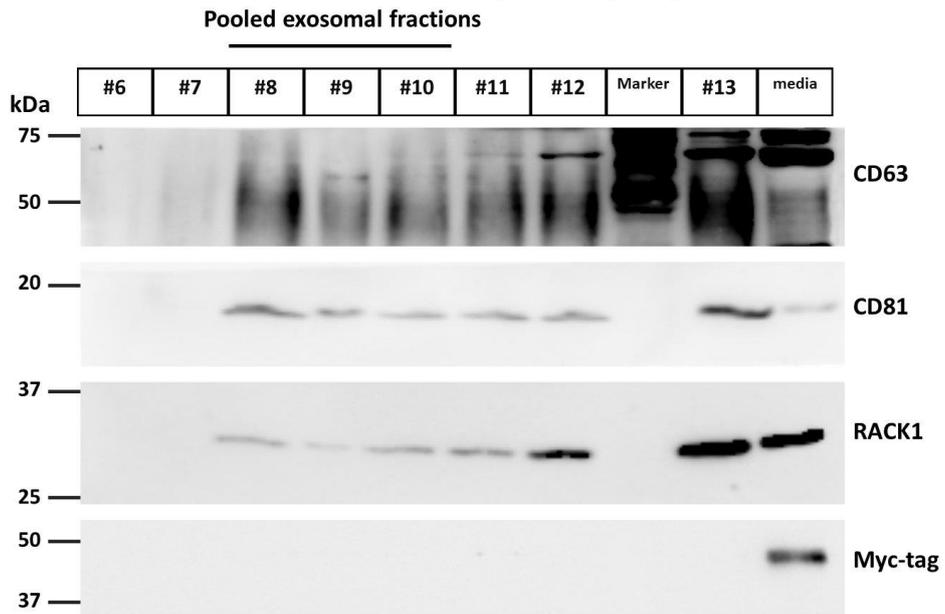
圖二、RACK1 在表現非典型 WNT5a 或 BIO 處理時細胞培養基中的變化。

(A) 表現非典型 WNT5a 或 BIO 處理的細胞溶解物中的蛋白質分析，*代表非專一性的訊號。(B) 表現非典型 WNT5a 或 BIO 處理的培養基，以免疫沉澱分析其中 RACK1 的量，#代表免疫沉澱中所使用抗體的 light chain 訊號。



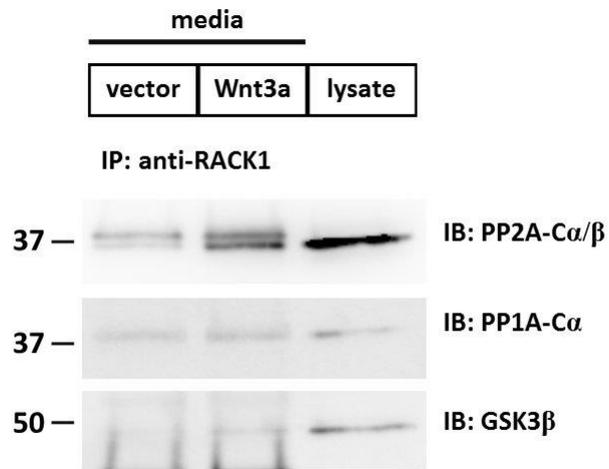
圖四、以穿透式電子顯微鏡觀察分離出的胞外體的形態與大小。

分離的胞外體經 2% uranyl acetate 染色後，以穿透式電子顯微鏡來觀察，圖中胞外體大小約在 30-80 nm 之間，並呈現典型的杯子形(cup-shaped)。比例尺為 100 nm。



圖五、以分子篩層析法分離出胞外體的部分。

將表現 RSPO1 細胞的 conditioned media 首先利用過濾膜去除分子大小在 200 nm 的顆粒，然後使用分子篩層析法(Size exclusion chromatography)分離出胞外體部分。經層析分離的各沖提部份(elution fractions)，利用 Western blot 分析偵測胞外體標誌(CD63 及 CD81)、RACK1 與 RSPO1-myc (myc-tag)在各沖提部份的訊號。



圖六、細胞外 RACK1 可與訊息調節分子交互作用。

表現 vector 或典型 WNT3a 的培養基，以免疫沉澱分析 RACK1 與 PP2A-Cα/β, PP1A-Cα及 GSK3β 的量。其中 vector lysate 是作為各抗體的 positive control。

參考文獻

- Beckett K1, Monier S, Palmer L, Alexandre C, Green H, Bonneil E, Raposo G, Thibault P, Le Borgne R, Vincent JP. (2013) Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes. *Traffic*. 14:82-96.
- Böing AN, Pol E. Van Der & Grootemaat AE. (2014) Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 3:23430
- Bosch S, De Beaurepaire L, Allard M, et al. (2016) Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci Rep*. 6:36162.
- Chang CF, Hsu LS, Weng CY, Chen CK, Wang SY, Chou YH, Liu YY, Yuan ZX, Huang WY, Lin H, Chen YH, Tsai JN. (2016) N-glycosylation of human R-Spondin 1 is required for efficient secretion and stability but not for its heparin binding ability. *Int J Mol Sci*. 17, 937.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 30:255-89.
- David R, Adams, Ron P and Patrick (2011) A Kiely: Cell Communication and Signaling 9:22.
- Duff D, Long A. (2017) Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. *Cell Signal*. 35:250-255.
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells, *J. Biol. Chem*. 285, 17442–17452.
- de Lau W, Peng WC, Gros P. and Hans CleversH. (2014) The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & Dev*. 28: 305-316
- Nusse R and Clevers H (2017). Wnt/ β -catenin signaling, Disease and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985-999.
- Yuyama K, SunH, Mitsutake S, Igarashi Y (2012) Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. *J. Biol. Chem*. 287,10977-10989.