

RACK1 与 CLIC1 的相互作用鉴定

李彩虹,朱亮亮,王蓓华,周恒,李强,朱昉修,范礼斌

摘要 目的 探究胞内氯离子通道蛋白 1 (CLIC1) 与活化蛋白激酶 C 受体 1 (RACK1) 在细胞内的相互作用。方法 构建重组质粒 pcDNA3.1-RACK1-HA, 转染质粒 pcDNA3.1-RACK1-HA 和 (或) pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 到 HEK 293T 细胞中, 转染 pcDNA3.1-RACK1-HA 和 (或) pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 到 COS7 中。GST-pulldown 和免疫共沉淀实验确定 CLIC1 和 RACK1 在体内及体外的相互作用。间接免疫荧光实验检测 RACK1 与 CLIC1 在细胞中的定位。结果 成功构建 pcDNA3.1-RACK1-HA, Western blot 检测结果证明了 RACK1 和 CLIC1 可在 HEK 293T 细胞中表达, GST-pulldown 结果显示 RACK1 与 CLIC1 在体外可直接结合, 免疫共沉淀结果显示 RACK1 和 CLIC1 可在细胞内结合。间接免疫荧光实验表明 RACK1 与 CLIC1 可共定位于细胞质。结论 RACK1 与 CLIC1 可在细胞中结合。

关键词 RACK1; CLIC1; 相互作用

中图分类号 R 34; Q 28

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1518-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.002

细胞中的氯离子通道在跨膜电位调节、跨上皮细胞运输以及细胞器的酸化等方面起着重要的作用^[1]。胞内氯离子通道蛋白 1 (chloride intracellular channel protein 1, CLIC1) 是最先被研究分析的人胞内氯离子通道蛋白, 具有核膜和质膜氯离子通道活性^[2]。CLIC1 在细胞周期调控^[3]、细胞器酸化^[4]以及细胞迁移^[5]等方面起着重要作用。活化蛋白激酶 C 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 蛋白在进化上非常保守, 属于 WD 重复家族的蛋白, 含有 7 个 WD40 基序, 构成一个 β -propeller 结构^[6]。RACK1 可作为支架蛋白参与蛋白质的迁移, 从而改变蛋白质的胞内定位来增加或减少蛋

白质(酶)的活性, 也参与调控蛋白质的翻译和转录因子等的活性^[7]。此外, RACK1 还可募集激酶和磷酸酶等参与斑点连接的形成^[7]。为了探究 CLIC1 的功能, 课题组先前用酵母双杂交的方法从 HeLa 细胞 cDNA 文库中筛选到一个 CLIC1 的结合蛋白, 即 RACK1。该研究用 GST-pulldown、免疫沉淀等方法检测 RACK1 与 CLIC1 在体内外的结合情况, 观察二者结合情况。

1 材料与方法

1.1 细胞与质粒 本实验所用的 HEK 293T 细胞和 COS7 细胞株、TG1 和 BL21 菌株均为实验室自存; 本实验所用到的质粒 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG、pGEX-5X3-RACK1 为先前研究^[8]所构建, pcDNA3.1-RACK1-HA 为本实验构建, 引物如下: 上游 CCAAGCTTGGGGCCACCATGACTGAGCAGATGA, 下游 GATATCCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGCGTGTGCCAATGGTCA。

1.2 试剂与设备 DMEM 高糖培养基(北京赛默飞世尔科技有限公司); 质粒提取试剂盒(美国 OMEGA 公司); 胎牛血清(澳洲 CLARK 公司); 胰酶细胞消化液(含 EDTA)、细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、一抗稀释液、Lipofectamine 8000 脂质体转染试剂(上海碧云天生物技术有限公司); 改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物有限公司); 质粒小抽试剂盒(美国 Axygen 公司); Opti-MEM[®] Medium(美国 Invitrogen 公司); 抗体: FLAG(F1804)(美国 Sigma 公司); HA(sc-7392)、CLIC1(sc-81873)、RACK1(sc-17754)、Mouse IgG(sc-52336)(美国 Santa Cruz 公司); SuperSignal West Pico 显色试剂盒(美国 Pierce 公司); IPTG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 和 AF488 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); 谷胱甘肽琼脂糖珠(美国 GE Healthcare 公司); A/G 琼脂糖珠(美国 Millipore 公司); 荧光封片胶(丹麦 DAKO 公司); Gelx-1620 凝胶成像分析系统(上海 Bioshine 科学仪器有限公

2022-05-10 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(编号: 11040606M170); 安徽医科大学双肩挑干部学术恢复科研专项(编号: 0112011109)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物系, 合肥 230032

作者简介: 李彩虹, 女, 硕士研究生;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn;

朱昉修, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者

司);激光共聚焦显微镜(型号:LSM880,德国 Zeiss 公司);BSC-II 级生物安全柜(美国 Thermo 公司);光吸收酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Microfuge 20R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 待 HEK 293T 或 COS7 细胞长满,PBS 清洗,胰酶消化收集细胞,以 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种到含 5% 胎牛血清的 DMEM (100 U/ml 青霉素 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养过夜。

1.3.2 质粒构建 以 pcDNA3.1-RACK1-FLAG 质粒为模板,PCR 扩增出含有 HA 标签的 RACK1 的 CDS 序列,并用试剂盒纯化回收琼脂糖凝胶电泳后的 PCR 产物,用 HindIII 和 EcoRV 双限制酶水解 pcDNA3.1 载体和纯化的 PCR 产物,然后用 T4 连接酶将两者的酶切产物进行连接;连接产物转化至 TG1 感受态细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 10 h 后挑取单克隆并扩大培养抽提重组的质粒,质粒用 HindIII、EcoRV 双限制酶酶切鉴定,鉴定正确的质粒送公司测序(通用生物系统有限公司)。

1.3.3 质粒转染 前 1 d 将细胞接种至六孔板中,使得次日 HEK 293T 或 COS7 细胞密度能达到约 90% 或 50%。转染前,将培养有细胞的六孔板每孔换成 2 ml 新鲜完全培养液,然后取一个无菌离心管,于待转染的六孔板中每孔加入所需的 Opti-MEM[®] Medium 和目的质粒 DNA,再加入适量的 Lipofectamine 8000 转染试剂,混合液均匀滴加到孔内混匀,细胞培养 48 h 后用于检测蛋白表达或 24 h 后用于免疫荧光制片。

1.3.4 GST、GST-RACK1 的表达及纯化 将质粒 pGEX-5X-3 或 pGEX-5X-3-RACK1 转化到 BL21 大肠杆菌中,挑取单克隆至含有 2 ml LB 培养基(含氨苄)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜。次日取 500 μl 菌液到含 50 ml LB(含氨苄)扩大培养,至 OD_{600} 为 0.4 ~ 0.6;30 $^{\circ}\text{C}$ 下,分别加入适宜浓度的诱导剂 IPTG 诱导其表达,收集细菌;细菌裂解液裂解,超声破碎;4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 10 min,取上清液,分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。分别取一管上清液离心并加入谷胱甘肽琼脂糖球珠,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 混悬孵育 2 h,孵育结束后离心弃上清液,沉淀用 GST 结合缓冲清洗液清洗后备用。

1.3.5 GST-pulldown 实验 质粒转染 HEK 293T 细胞 48 h 后,离心收集细胞,然后向细胞中加入适量裂解液,裂解后的上清液加入到纯化好的 GST 或 GST 融合蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 混悬孵育 4 h,离心收集谷胱甘肽琼脂

糖珠子,珠子中加入 SDS 上样缓冲液,变性后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.3.6 免疫共沉淀实验 质粒转染 HEK 293T 细胞(内源性免疫沉淀中细胞不转染质粒),48 h 后收集细胞,然后加入适量细胞裂解液,裂解结束向裂解液中加入适量的 FLAG 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 混悬 2 h。结束后加入 20 μl A/G 琼脂糖球珠,4 $^{\circ}\text{C}$ 混悬 4 h。离心并收集珠子。最后加 SDS 上样缓冲液变性,对照样品(细胞裂解液)直接用 SDS 上样缓冲液变性。

1.3.7 免疫荧光实验 质粒转染后约 24 h,取出长有 COS7 细胞的盖玻片,用预冷的甲醇固定,然后用 1% 脱脂牛奶封闭,室温一抗孵育 2 h、二抗孵育 1 h(一抗、二抗均用 1% 脱脂牛奶稀释,稀释比例 1 : 100),DAPI 孵育细胞 3 min,最后用封片胶封片,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,激光共聚焦显微镜观察拍摄。

1.3.8 Western blot 法检测蛋白表达 SDS-PAGE 后,凝胶上的蛋白电转至 PVDF 膜上(PVDF 膜临用前用甲醇活化)。PVDF 膜用脱脂牛奶封闭 1.5 h,然后用相关的适量一抗(1 : 1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后再用二抗(1 : 2 500)室温孵育 1.5 h,最后用 ECL 试剂盒显色并在蛋白成像仪上进行拍摄。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-RACK1-HA 重组质粒构建 以 pcDNA3.1-RACK1-FLAG 作为模板,用 PCR 法将 RACK1 全长 cDNA 序列构建到 pcDNA3.1 载体中。构建的重组质粒双酶切(HindIII、EcoRV)4 h 后,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳(图 1A)。图中酶切后的质粒呈现两条 DNA 带,下端的 DNA 带分子量与预测的 RACK1 全长序列分子量一致。构建的质粒送公司测序,测定的序列与 RACK1 全长序列相同(图 1B)。

2.2 CLIC1 与 RACK1 可在体外结合 转染 CLIC1-FLAG 的 HEK 293T 细胞经裂解后,裂解液与预先纯化好的 GST 和 GST-RACK1 融合蛋白在 4 $^{\circ}\text{C}$ 混悬仪孵育(孵育前取适量裂解液作为对照),样品经 Western blot 检测后,结果见图 2,用 FLAG 抗体印迹后,细胞裂解液中有较强的 CLIC1 表达(27 ku)(图 2A,泳道 1)。对照组(图 2A,泳道 2)无蛋白带,显示 GST 不能结合 CLIC1-FLAG;而样品组中 GST-RACK1 可以结合 CLIC1-FLAG(图 2A,泳道 3)。图 2B 显示共孵育溶液中 GST(25 ku)(泳道 2)和 GST-RACK1(62 ku)(泳道 3)。此结果表明 CLIC1 可在体外结合 RACK1。

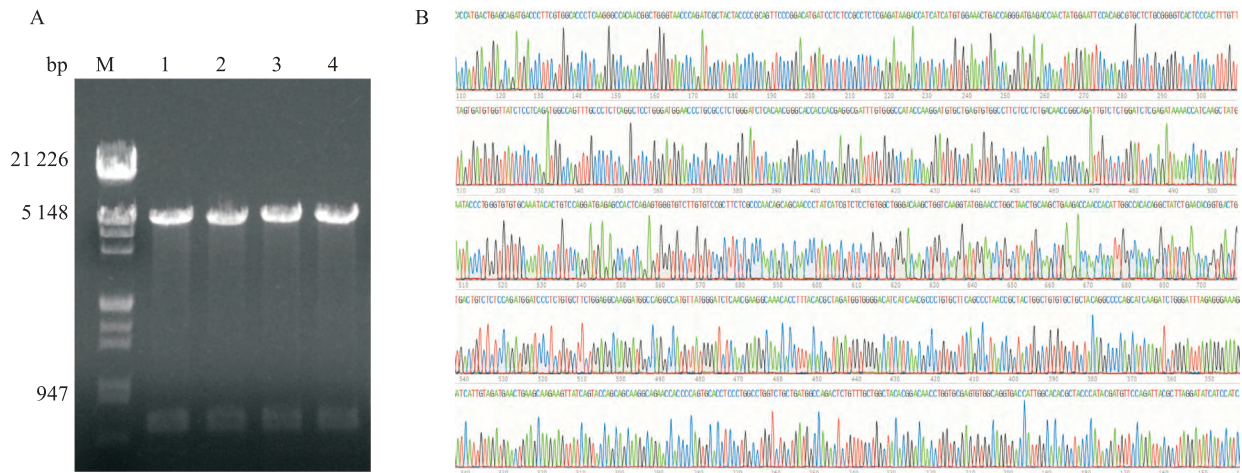


图1 pcDNA3.1-RACK1-HA 重组质粒构建

A: pcDNA3.1-RACK1-HA 重组质粒酶切电泳结果; M: λ DNA/EcoR I + Hind III Marker; 1~4: 随机挑取的细菌克隆的质粒 DNA; B: pcDNA3.1-RACK1-HA 重组质粒中全长 RACK1 序列测序结果

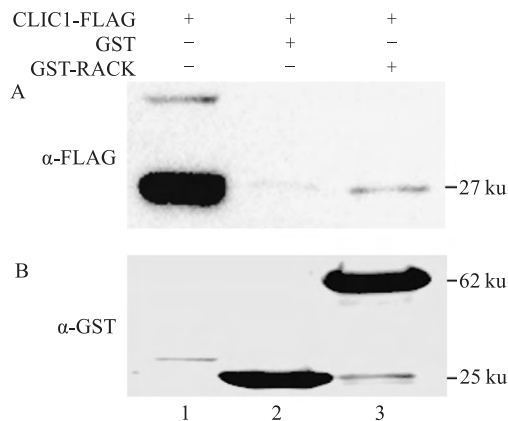


图2 CLIC1 与 RACK1 的 GST-pulldown 结果

1: pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的细胞裂解液; 2: 转染 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的细胞裂解液与已纯化的 GST 共孵育; 3: 转染 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的细胞裂解液与已纯化的 GST-RACK1 共孵育

2.3 CLIC1 可体内结合 RACK1 将 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 与 pcDNA3.1-RACK1-HA 两种质粒共转染至 HEK 293T 细胞 48 h 后, 裂解细胞, 细胞裂解液 (Lysates) 经 FLAG 抗体孵育和 A/G 琼脂糖球珠沉淀后, 对蛋白样品进行免疫印迹, 结果见图 3。从图 3 中可以看到, FLAG 抗体沉淀中存在 RACK1 (泳道 4), 而对照中 (泳道 3) 不存在。此结果表明过表达的 CLIC1 和 RACK1 可在 HEK 293T 细胞中结合。

为了确定细胞中内源性的 CLIC1 和 RACK1 是否可以结合, 本研究直接裂解 HEK 293T 细胞, 裂解液 (Lysate) 与 RACK1 抗体孵育 (对照与鼠 IgG 孵育), 然后用 A/G 琼脂糖球珠沉淀, 最后进行免疫印迹分析。结果 (图 4) 表明 293T 细胞均含有丰富的 CLIC1 和 RACK1 蛋白 (泳道 1), RACK1 抗体沉淀

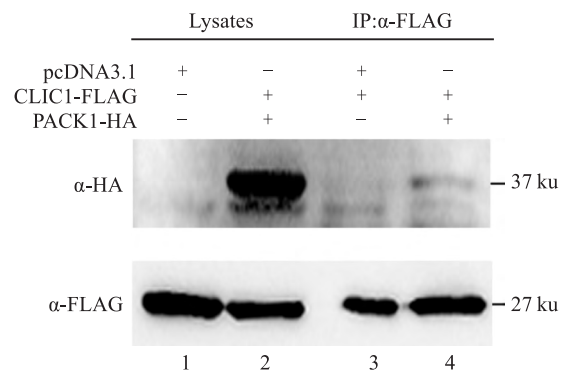


图3 RACK1 与 CLIC1 的免疫共沉淀结果

1: 载体 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 共转的细胞裂解液; 2: pcDNA3.1-RACK1-HA 和 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 共转的细胞裂解液; 3: 载体 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 共转的细胞裂解液与 FLAG 抗体以及 A/G 琼脂糖球珠孵育后的沉淀; 4: pcDNA3.1-RACK1-HA 和 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 共转的细胞裂解液与 FLAG 抗体以及 A/G 琼脂糖球珠孵育后的沉淀

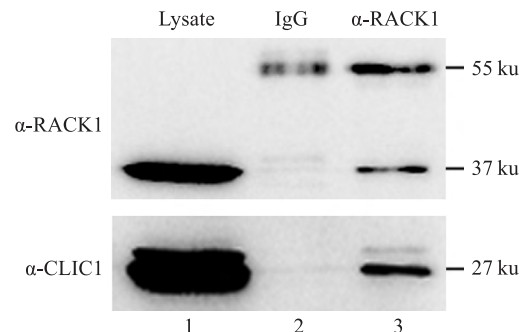


图4 RACK1 与 CLIC1 的内源性免疫沉淀结果

1: HEK 293T 细胞裂解液; 2: 鼠 IgG 和 A/G 琼脂糖球珠与细胞裂解液孵育后的沉淀; 3: RACK1 抗体和 A/G 琼脂糖球珠与细胞裂解液孵育后的沉淀

中含有 CLIC1 (泳道 3), 而对照抗体沉淀中没有 CLIC1 (泳道 2)。

上述实验证实了在细胞中 CLIC1 可与 RACK1 结合。

2.4 RACK1 与 CLIC1 在 COS7 细胞中的定位

蛋白质在细胞中的共定位可为蛋白质之间的结合提供进一步的证据。为此, 本研究在 COS7 细胞中共转染了质粒 pcDNA3.1-RACK1-HA 和 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG, 转染 24 h 后进行免疫荧光制片, 并用荧光显微镜观察拍摄。结果表明, 在 COS7 细胞中, CLIC1 和 RACK1 在胞质中具有明显的共定位 (图 5)。

3 讨论

RACK1 是一个进化上高度保守的蛋白质, 主要由 7 个 WD40 结构域组成^[6], 许多实验都表明 RACK1 是一个介导细胞内多种功能的支架蛋白。例如 RACK1 可以介导蛋白激酶 C β 转移到合适的胞内部位, 并活化 PKC β ^[6]; 已报道的 RACK1 结合蛋白基本上都是与 RACK1 羧端的 WD40 结构域结合, 例如 β 整合素蛋白、Src 激酶等^[6]。本研究中过表达免疫沉淀实验也表明 CLIC1 与 RACK1 的羧端

结合 (结果尚未发表)。

研究发现的一类氯离子通道蛋白 (chloride intracellular channel, CLIC) 家族由 7 个成员组成, 成员之间的序列相同性介于 47% ~ 76%^[9], 均具有介导氯离子跨膜运输和谷氧化还原蛋白样 (glutaredoxin-like) 活性^[10]。不同的 CLIC 蛋白在细胞内也具有自身特有的功能, 例如胞内氯离子通道蛋白 4 (chloride intracellular channel protein 4, CLIC4) 在细胞中过表达可诱导细胞的凋亡^[11]。CLIC1 含有一个保守的谷胱甘肽-S-转移酶折叠并具有该酶活性, 受到氧化时, CLIC1 可形成二聚体并与其通道活性密切相关^[12]。CLIC1 是作为细胞内的氯离子通道而被分析鉴定的, 它可以在人工膜中形成离子通道, 其通道活性受到 pH 的影响。有研究^[5]显示 CLIC1 可以影响肿瘤细胞的迁移性, 而且对其机制有所了解。有研究^[13]表明定位于质膜的 CLIC1 可以募集胞质中的 PIP5K1A 和 PIP5K1C 到质膜的前移部位, 产生富含 PIP₂ 的微结构域以诱导整合素介导的细胞-基质黏附并发出细胞骨架延伸的信号, 启动“PIP₂-tal-in-integrin”信号通路, 促进细胞基质黏附形成和信号转导, 从而在肿瘤转移过程中对细胞的片状伪足和丝状伪足进行时空调控, 此结果初步阐明了 CLIC1

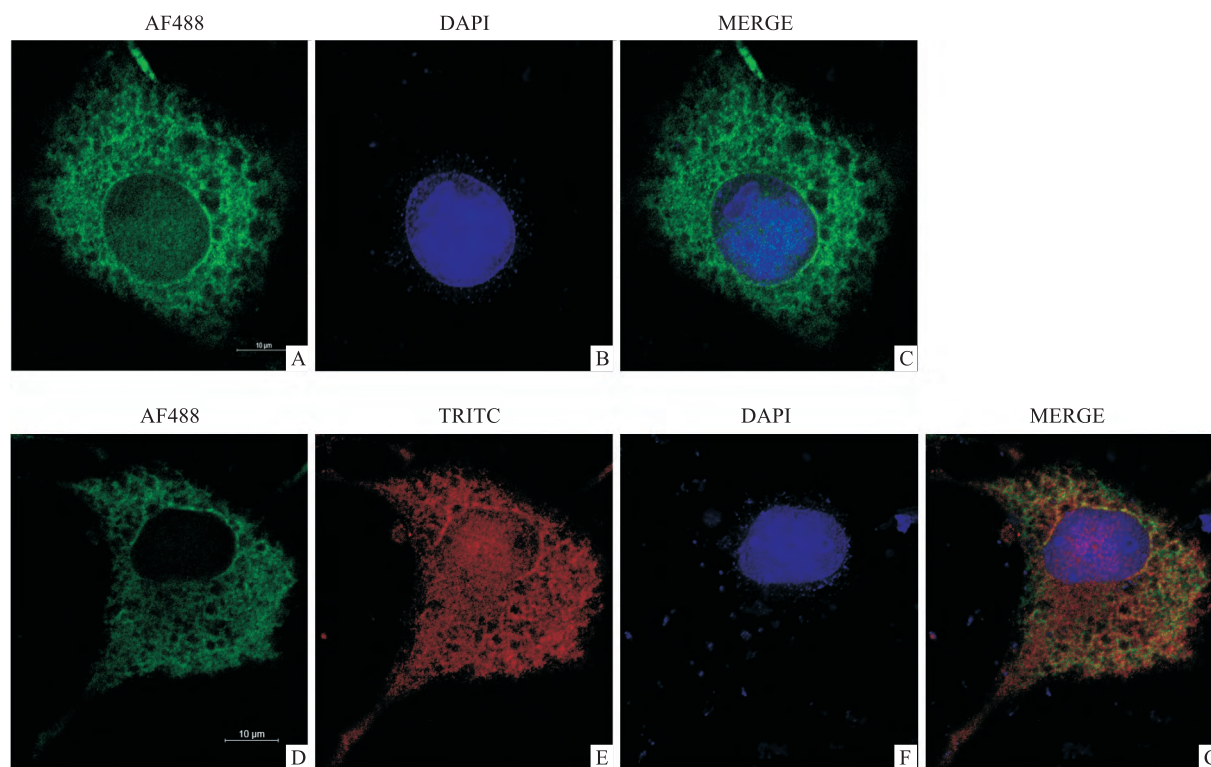


图 5 RACK1 与 CLIC1 在 COS7 细胞中的共定位 $\times 400$

A - C: 过表达的 pcDNA3.1-RACK1-HA 在细胞中的分布; D - G: 过表达的 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 和 pcDNA3.1-RACK1-HA 的共定位; AF488: 绿色 (pcDNA3.1-RACK1-HA); DAPI: 蓝色 (细胞核); TRITC: 红色 (pcDNA3.1-CLIC1-FLAG); MERGE: 叠加

介导肿瘤细胞转移的一个可能的机制。由于 RACK1 和 CLIC1 在细胞质膜上都有分布(本实验表明 CLIC1 存在于多种细胞的质膜上),而且 RACK1 可以介导蛋白激酶 C 转移到质膜并活化蛋白激酶 C,这些为进一步研究 RACK1 和 CLIC1 在细胞质膜上的关系并探讨其功能提供了重要线索。

在血清刺激后,细胞中 RACK1 表达明显上调,提示 RACK1 可能参与细胞周期的调节^[6],而 CLIC1 也参与细胞周期中 G₂/M 期的转变^[4],且在许多肿瘤细胞中 CLIC1 都是高表达的^[14],因此在未来的研究中有必要详细解析 RACK1 和 CLIC1 的相互作用对细胞周期影响的机制。

本研究利用 GST-pulldown、免疫共沉淀以及间接免疫荧光显微技术证明 RACK1 与 CLIC1 可以在细胞中相互结合。

参考文献

- [1] Strange K, Emma F, Jackson P S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(3 Pt 1):C711–30.
- [2] Valenzuela S M, Martin D K, Por S B, et al. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(19):12575–82.
- [3] Peretti M, Angelini M, Savalli N, et al. Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(10 Pt B):2523–31.
- [4] Valenzuela S M, Mazzanti M, Tonini R, et al. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle [J]. *J Physiol*, 2000, 529 Pt 3(Pt 3):541–52.
- [5] Jiang L, Salao K, Li H, et al. Intracellular chloride channel protein CLIC1 regulates macrophage function through modulation of phagosomal acidification [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 22):5479–88.
- [6] McCahill A, Warwicker J, Bolger G B, et al. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(6):1261–73.
- [7] Adams D R, Ron D, Kiely P A. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function [J]. *Cell Commun Signal*, 2011, 9:22.
- [8] 乔正,赵健,潘林鑫,等. RACK1 蛋白在 HEK293T 和 BL-21 细胞中的表达及 COS7 细胞中的定位[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9):1189–92.
- [9] Cromer B A, Morton C J, Board P G, et al. From glutathione transferase to pore in a CLIC [J]. *Eur Biophys J*, 2002, 31(5):356–64.
- [10] Al Khamici H, Brown L J, Hossain K R, et al. Members of the chloride intracellular ion channel protein family demonstrate glutaredoxin-like enzymatic activity [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):e115699.
- [11] Fernández-Salas E, Suh K S, Speransky V V, et al. mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53 [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(11):3610–20.
- [12] Harrop S J, DeMaere M Z, Fairlie W D, et al. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48):44993–5000.
- [13] Peng J M, Lin S H, Yu M C, et al. CLIC1 recruits PIP5K1A/C to induce cell-matrix adhesions for tumor metastasis [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(1):e133525.
- [14] Averaimo S, Milton R H, Duchon M R, et al. Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): Sensor and effector during oxidative stress [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(10):2076–84.

The interaction of RACK1 with CLIC1 in cells

Li Caihong, Zhu Liangliang, Wang Beihua, Zhou Heng, Li Qiang, Zhu Fangxiu, Fan Libin

(Dept of Biology, School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the interaction between intracellular chloride ion protein 1 (CLIC1) and activated protein kinase C receptor 1 (RACK1). **Methods** Plasmids pcDNA3.1-RACK1-HA and/or pcDNA3.1-CLIC1-FLAG were transfected into HEK 293T cells, and pcDNA3.1-RACK1-HA and/or pcDNA3.1-CLIC1-FLAG were transfected into COS7. GST-pulldown and immunoprecipitation assays were performed to determine the interaction between CLIC1 and RACK1 *in vivo* and *in vitro*. The co-localization of CLIC1 and RACK1 was observed by indirect immunofluorescence assay. **Results** Western blot confirmed that CLIC1 and RACK1 could be highly expressed in HEK 293T cells. GST-pulldown showed that RACK1 bound CLIC1 *in vitro*, and immunoprecipitation showed that CLIC1 and RACK1 interacted *in vivo*. Furthermore, indirect immunofluorescence assay showed CLIC1 co-localized with RACK1. **Conclusion** Human CLIC1 protein interacts with RACK1 *in vitro* and *in vivo*.

Key words RACK1; CLIC1; interaction