

國立臺灣大學生命科學院生命科學系碩士論文

Department of Life Science

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

囊泡型 ATPase V0d1 次單元蛋白調節 γ -Secretase 分

解類澱粉前驅蛋白與 Notch 蛋白之反應

The Differential Modulation of γ -Secretase-mediated
Cleavages of Amyloid Precursor Protein and Notch by the
Vacuolar ATPase V0d1 Subunit

研究生：童永豪 Yung-Hao Tung

指導教授：廖永豐 Yung-Feng Liao 博士

潘建源 Chien-Yuan Pan 博士

中華民國一〇三年一月

January, 2014



誌謝

2010年2月28日，我正坐在學校的交通車上，心裡想著今天是研究所放榜日，這時我突然接到一通沒有在聯絡人名單中的簡訊，簡訊中寫著“恭喜學長考上了”，我坐在交通車裡，心裡想著是哪一個學弟妹的惡作劇，便沒有放在心上的到了學校，用圖書館的電腦查了一下榜單，才知道不是惡作劇，雖然我到現在還是不知道那封簡訊是誰寄給我的。


時間過得飛快，轉眼之間我參與了兩次實驗室年終掃除，也是要離開的時候了。首先我要感謝廖永豐老師對我的指導，老師每次談話都苦口婆心的再三叮嚀基礎，實驗上也多多提醒我需要注意的地方，同時因為老師的以身作則讓我學習到很多，非常感謝老師。另外感謝柏堅學長與維斌學長，在我的實驗遇到困難時給予指導與建議，因為學長們豐富的經驗減少了許多的冤枉路。接下來感謝盈岑學姊與明筠學姊教導我實驗基礎，讓從來沒有實驗室經驗甚至非生物相關背景的我能夠進行實驗，同時也是在我遇到困難時討論疑問的對象。

感謝 Selina、韻文與士禎提供實驗上的經驗與嘗試，也討論許多生活問題與分享經驗。感謝潘老師與范姜助教協助我解決各種行政與學校方面的問題。感謝文笙介紹許多戶外運動，為我的實驗室生活增添色彩與健康。感謝阿凸酸民寒波送我實驗室搬家時整理出來的過期泡麵，讓我免於在寒冷的冬夜挨餓受凍。也感謝幾乎很少見面的動物所同學，忍受我在 FB 上的碎碎念還有幫我按讚。

雖然我沒有什麼特別的信仰，但是還是要謝天，給予我這樣人生的機運。最後我要感謝細胞，他們都長得好好的，讓我能夠進行實驗，雖然我們實驗室沒有做太多動物實驗，我也沒有經手任何動物實驗，不過算一算因為實驗而死亡的細胞也可以說是不計其數了。

如果說什麼永遠不會忘記之類的話太過老套的話，那就老套一點吧。

中文摘要



阿茲海默症為全世界 65 歲以上老人失智症的主要原因，不斷增加的研究證據指出了病人腦中， γ -seacretase 調控 amyloid- β 的製造與此疾病之間有緊密關係，因此一種治療或減緩病程的策略乃降低 γ -seacretase 製造 amyloid- β 之活性。近期研究已發現了數個與 γ -seacretase 具交互作用之蛋白質，具有調控 γ -seacretase 活性之能力。本實驗室先前的 RNAi 篩選發現，囊泡型 ATPase V0 的 d1 次單元(ATP6V0d1) 為 γ -seacretase 可能之調控者，為進一步明瞭此蛋白對 γ -seacretase 活性調控之角色，因此在表現 ATP6V0d1 之情況下，分別檢驗 γ -seacretase 所催化之 amyloid precursor protein (APP-C99)與 Notch (N Δ E)蛋白水解的反應。實驗結果結果顯示了表現 ATP6V0d1 對於 γ -seacretase 所調控之 N Δ E 之水解具有顯著之增強現象，同時降低了細胞內 APP-C99 之表現量，此一發現顯示了 ATP6V0d1 可能選擇性的影響了 γ -seacretase 與其受質的作用。

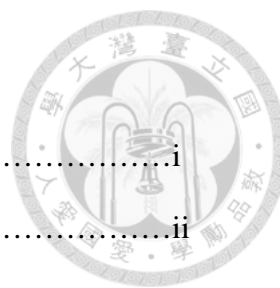
關鍵字:阿茲海默症、 γ -seacretase、類澱粉前驅蛋白、Notch 路徑、囊泡型 ATPase、溶小體、ATP6V0d1

Abstract



Alzheimer's disease (AD) is one of the major causes of dementia among people over age of 65 around the world. Accumulated studies have shown a significant correlation between the AD pathogenesis and the γ -secretase-mediated ($A\beta$) production in the patient's brain. One of the possible strategies to cure or slow the disease progression of AD is to reduce γ -secretase activity to lower $A\beta$ production. Recent reports have found a number of γ -secretase-interacting proteins that could potentially play a role in the modulation of γ -secretase activity. Our RNAi screen identified one of the γ -secretase-interacting proteins, vacuolar ATPase V0 domain d1 subunit (ATP6V0d1) as a possible γ -secretase modulator. To validate its role in the modulation of γ -secretase activity, γ -secretase-catalyzed cleavages of amyloid precursor protein (APP-C99) and Notch (N Δ E) were examined in response to the overexpression of ATP6V0d1. Our result demonstrated that overexpression of ATP6V0d1 does not significantly enhance the γ -secretase-mediated cleavage of N Δ E, and also markedly reduce the APP-C99 level. These findings suggest that ATP6V0d1 could act as a modulator by differentially governing the interactions between γ -secretase and its selective substrates.

Key word: Alzheimer's disease, γ -secretase, APP, Notch pathway, vacuolar ATPase, lysosome, ATP6V0d1



目錄	
致謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
緒論.....	1
實驗動機.....	7
研究材料.....	8
研究方法.....	13
研究結果.....	18
討論與結論.....	20
參考資料.....	24



圖目錄

圖一. NG 細胞株中 ATP6V0d1 對於 γ -secretase 活性之影響.....	34
圖二. C99 細胞株中 ATP6V0d1 對於 γ -secretase 活性之影響.....	35
圖三. 抑制劑處理 C99 細胞株對於 γ -secretase 活性之影響.....	36
圖四. 抑制劑處理 NG 細胞株對於 γ -secretase 活性之影響.....	37
圖五. C99 細胞株 Lysosome 酸鹼值實驗結果.....	38
圖六. NG 細胞株 Lysosome 酸鹼值實驗結果.....	39
圖七. C99 細胞株 γ -secretase 活性之 Luciferase 報導基因實驗結果.....	40
圖八. NG 細胞株 γ -secretase 活性之 Luciferase 報導基因實驗結果.....	41
附圖目錄	
附圖一. C99 細胞株免疫染色實驗結果.....	42
附圖二. NG 細胞株免疫染色實驗結果.....	43

緒論

阿茲海默症

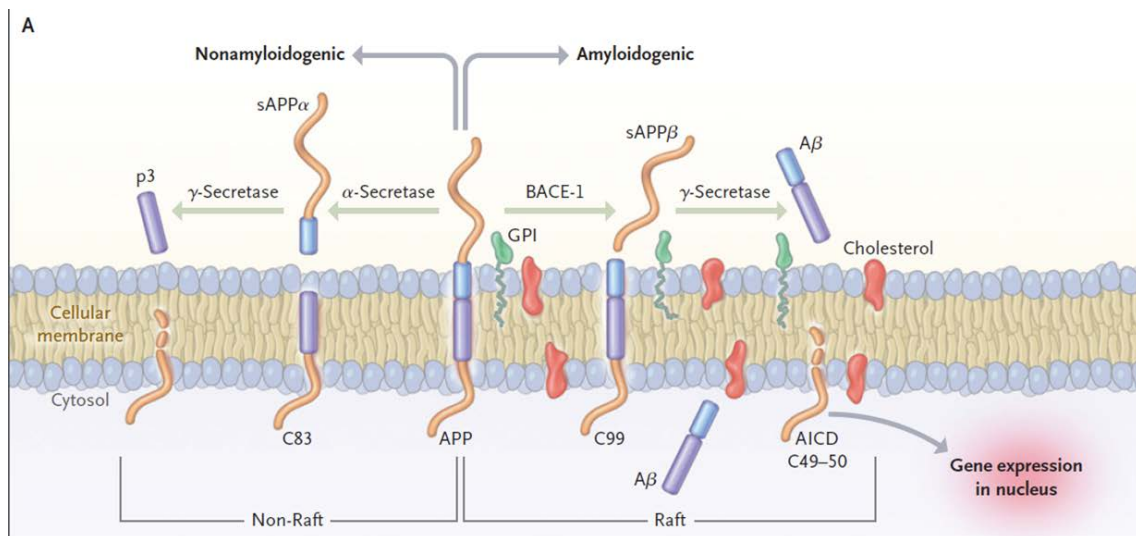
阿茲海默症為失智症之主要原因之一，其好發於 65 歲以上之老年人，主要症狀包況記憶力喪失、語言與邏輯能力下降、運動功能遲緩，生活功能嚴重受影響，至 2010 年為止全球失智症患者估計達 3560 萬人，其中以阿茲海默症為主因之老年失智症比例可高達 70%。因為患者自理生活之能力嚴重不足，故病人數之增加對許多國家之醫療與長期照護體系帶來嚴重之衝擊(Hebert et al. 2000; WHO 2010; Hirtz et al. 2007)。以美國為例，阿茲海默症於十大死因中排名第七，直到 2008 年全美國估計有超過 520 萬名阿茲海默症病患，而照顧這些病患的非職業照護者更高達 1000 萬人，付出了 84 億的等效工時與相當於 890 億美元的醫療照護成本(Alzheimer's Association 2008)。

此疾病於 1907 年由 Alois Alzheimer 醫生發現，患者腦部可見明顯之萎縮，其中又以海馬迴(Hippocampus)與額葉皮質(frontal cortex)區域最為嚴重，病理組織的切片中，則有明顯的細胞外斑塊(senile plaues)與神經細胞內部纖維糾結(neurofibrillary tangles)之病理特徵，細胞外斑塊主要由 β -類澱粉蛋白 (β -類澱粉蛋白) 所構成，而細胞內纖維糾結則是由於細胞骨架相關之 tau 蛋白過度磷酸化所造成(Serrano-Pozo et al. 2011)。

目前被廣為接受的致病機轉為 β -類澱粉蛋白假說 (Amyloid hypothesis)，此一假說認為細胞所表現之類澱粉前驅蛋白 Amyloid Precursor Protein (APP)在經過酵素的切割作用下產生具有細胞毒性的 β -類澱粉蛋白，這種蛋白質藉由其 β 折板狀 (β -sheet)構造而聚集堆積形成更大的聚合體，而造成細胞凋亡、鈣離子平衡喪失、活化神經膠細胞產生發炎反應等影響，而對神經細胞造成傷害(Selkoe et al.2001; Busciglio et al. 2002;Haass et al.2007)。

類澱粉前驅蛋白 Amyloid Precursor Protein (APP)

APP 為一穿膜蛋白質，其蛋白質 N 端朝向胞外或膜腔，C 端朝向細胞質 (Kang et al.1987)，該蛋白質主要功能目前尚無定論，其在細胞中之水解路徑可分為兩種，分別為 amyloidogenic 與 nonamyloidogenic 路徑，分別由 α 、 β 、 γ 三種分泌酶催化，在 amyloidogenic 路徑中，APP 蛋白質受到 β -secretase (BACE1) 酵素之切割而產生一較短之 C99 (或稱 β CTF) 蛋白質，C99 再受到 γ -secretase 切割其穿膜部位而產生一胞外之 β -類澱粉蛋白與胞內之 AICD 片段 (Busciglio et al. 1993; Haass et al. 1992b; Seubert et al. 1992)，其中胞外之 β -類澱粉蛋白被認為是造成阿茲海默症之原因。有關於 β -類澱粉蛋白性質之研究多來自於人工合成之 β -類澱粉蛋白， β -類澱粉蛋白於腦中或離體實驗環境下會因為其 β 折板狀構造而聚合成雙倍體、三倍體、寡合體或是更大的纖維狀聚合物，並且與體內之金屬離子、細胞膜及其他蛋白質產生交互作用而影響諸多細胞生理表現 (Duce et al. 2010; Faller et al. 2009; Li et al. 2009; Relini et al. 2009; Shankar et al. 2007)。



(圖片來自 Querfurth and LaFerla. 2010)

γ -Secretase

γ -Secretase 為一由四個次單元所組成之膜蛋白酶，其功能為切割其他單次穿膜蛋白之穿膜位置，組成 γ -secretase 之次單元蛋白分別



為 presenilin, nicastrin(NCT), Anterior pharynx-defective 1 (APH-1), 與 Presenilin enhancer 2 (PEN-2) (De Strooper et al. 1999; Steiner et al. 2008), 此四個次單元蛋白對於 γ -secretase 之正常組合與功能缺一不可(Edbauer et al. 2003), 其中 presenilin 為主要之酵素活性單元(Wolfe et al. 1999), NCT 則可能扮演受質選擇之角色(Dries et al. 2009; Shah et al. 2005), 而 PEN-2 似乎促進了 presenilin 之酵素活性並且將其穩定於整個 γ -secretase 之中(Hasegawa et al. 2004; Prokop et al. 2004), 有關於 APH-1 則尚無確切之研究, 不過其可能構成了酵素組合初期之連結之骨架(LaVoie et al. 2003)。除了 C99 之外, γ -secretase 尚具有其他的受質如 Notch 受器膜蛋白, 近年來更有超過 90 種不同的 γ -secretase 受質被陸續發現(Haapasalo and Kovacs 2011; Hemming et al. 2008; McCarthy et al. 2009)。過去對於 γ -secretase 於細胞中切割 C99 之位置有所爭議, 而近期之研究證據則傾向於顯示神經細胞中成熟且具有酵素活性之 γ -secretase 主要表現於細胞膜、內噬體(Endosome)膜與溶小體(Lysosome)膜上(Dries and Yu 2008; Kaether et al. 2006; Nixon 2007; Pasternak et al. 2004), 顯示這些地點皆為可能之 β -類澱粉蛋白產生區域, 而既使投入了許多研究精力, 對於 γ -secretase 於神經細胞內切割 C99 之確切位置依然有待證實。

Notch 訊息路徑

Notch 受器表現於細胞表面, 與表現於相鄰細胞表面之 DSL 蛋白質(Delta, Serrate, LAG-2 家族)接觸下而活化, 活化後之 Notch 受器將經過兩步驟之蛋白水解反應, 第一步驟為 ADAM 所調控之水解反應釋放與受質結合之胞外區域, 第二步驟則發生於接受器之穿膜區域, 由 γ -secretase 所進行, 此一水解反應將會釋放出一細胞內片段, 稱為 NICD(Notch intra-cellular domain), 而 NICD 將會轉移至細胞核內招集轉錄因子而影響其下游基因之表現。此一路徑於 1914 年被發現, 多年累積之研究結果顯示此路徑於生物發育過程中細胞分化之重要功能, 其在脊椎與無脊椎生物上之研究皆顯示, Notch 路徑為生物體正常生長發育所必須

(Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Louvi et al. 2006)。




阿茲海默症藥物

目前市面上所使用治療阿茲海默症之藥物作用機制為提高患者腦內乙醯膽鹼之濃度，以改善病患之認知能力，但是藥效隨病程而逐步遞減，僅對於輕度與中度患者具療效並且無法減緩病程，而對於新藥物之研究亦從各種不同之策略著手，早期的研究開發出了許多的小分子 γ -secretase 抑制劑(γ -secretase inhibitor, GSI)但是這些抑制劑對於病情的改善並不一定具有良好的效果。另因 γ -secretase 於 Notch 訊息路徑所扮演之重要功能(De Strooper et al. 1999; Levitan and Greenwald 1995)，在許多物種中抑制 γ -secretase 活性會造成 Notch 訊息路徑無法正常表現，導致許多嚴重生長發育異常現象(Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Louvi et al. 2006)，所以對 Notch 訊息路徑之影響已成為研究 γ -secretase 抑制劑作為阿茲海默症治療方式上之重要考量。近年來之研究發現更多 γ -secretase 之受質或甚至其蛋白質水解以外之功能，故讓 γ -secretase 失去活性並非最適當的治療策略，因此治療策略朝向多元化發展，其中一種策略為找尋能夠調節 γ -secretase 功能之目標，改變 γ -secretase 產生類澱粉蛋白之特性，如增加較不具毒性之 A β 40 與 A β 38 之產生，或是在不影響 γ -secretase 其他活性之狀況下減少類澱粉蛋白之產生(Wagner et al.2012)。

Vacuolar-type H⁺-ATPase

Vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase)為細胞內調節酸鹼值之氫離子幫浦，其利用水解 ATP 所產生之能量主動運輸氫離子通過膜結構而造成胞器內部之酸化反應，此一酸化反應對細胞生理之影響包括內噬小體(endosome)的形成(Clague et al. 1994)、細胞內蛋白質分類與運輸(Klionsky et al. 1992)、細胞物質分泌(Moriyama et al. 1992; Sahagian et al. 1994)、細胞內囊泡融合(White 1992)與囊泡內水解酵素之活化(Stevens et al. 1997)。V-ATPase 主要表現在溶小體(Lysosome)、內噬小體、分泌性



囊泡(Secretory vesicle)與高基氏體(Golgi apparatus)中，其由兩個主要的 domain 所構成，包含表現於細胞質中之親水端 V1 與表現於膜上之疏水端 V0，每一 domain 則由數個次單元蛋白所構成，每一次單元蛋白具有各自之功能。以被廣泛研究的酵母菌 V-ATPase 為例，V1 domain 具有 8 個次單元蛋白，分別是 A、B、C、D、E、F、G、H，而 V0 domain 則具有 a、c、c'、c'' 以及 d 共五個次單元蛋白(Anraku et al. 1992; Forgac 2007)。

在 V1 domain 中以三個 A 與三個 B 次單元蛋白形成一 hexamer 結構，以作為水解 ATP 之反應核心，下方則由次單元蛋白 D 與 F 組合成一旋轉軸心，於 ATP 水解時將質子向下運送，而除了 H 次單元蛋白以外之其他次單元蛋白則於中央轉軸旁組合成周邊軸並與 V0 domain 相連結。而 V0 domain 則位於膜上，其中以 c、c'、c'' 形成一可轉動之結構連接 V1 之中央轉軸，當 ATP 與 V1 水解而轉動時帶動此一結構共同轉動，將質子運輸至 a 次單元蛋白最終進入膜腔內(Forgac 2007)。

V-ATPase V0 domain d 次單元蛋白為一疏水性蛋白質，大小約為 38kDa，為 V-ATPase 最晚被研究之成員，在人體中具有 d1 與 d2 兩種異構物，d1 廣泛表現於人體細胞而 d2 則表現於特定組織中，如腎臟與骨骼細胞，且分屬兩不同之基因(Smith et al. 2002)，其中 d1 由 ATP6V0d1 基因所轉譯。d 次單元蛋白在 V-ATPase V0 domain 中之位置尚具兩種假說，其中一假說認為其位於 V-ATPase V1 與 V0 之交接處，參與了中央轉軸之組裝(Iwata et al. 2004; Numoto et al. 2004)，對於細胞中 V-ATPase 之活性具有直接之影響；一假說則認為其位於周邊軸上(Thaker et al. 2007)。目前研究所顯示 d 次單元蛋白可能具有多種功能，包括協助穩定 V-ATPase 之完整性、調控 V-ATPase 之組合與影響 V-ATPase 之工作效率(Bauerle et al. 1993; Smith et al. 2008; Tsuyoshi et al. 2003)。

d 次單元蛋白與 γ -secretase 之關係於 2009 年 Wakabayashi 等人之研究中被發現，該研究透過 Tandem affinity purification (TAP) 技術篩選出與 γ -secretase 具交互作用之蛋白質，其中有關於離子運輸之蛋白質分別為 Na⁺/K⁺ ATPase1、SERCA2、

V-ATPase d1、V-ATPase A、VDAC-1 與 Proteolipid protein，這些與 γ -secretase 具交互作用之蛋白質皆有可能扮演 γ -secretase 調控者之角色(Wakabayashi et al. 2009)。



研究動機

本實驗室以做為未來可能之藥物開發目標為基礎概念，參考 2009 年 Wakabayashi 等人之研究，以 RNAi 篩選出目標蛋白以進行實驗，希望能釐清其對於 γ -secretase 活性之影響。因 γ -secretase 參與細胞生理作用相當廣泛，為避免其活性改變進而影響到細胞正常生理功能，本研究之目的希望找出對 γ -secretase 活性具選擇性之調控機制，因此除了阿茲海默症致病機制相關 β -類澱粉蛋白 (amyloid- β protein) 生成路徑外，亦選擇另一與細胞生理重要相關之 Notch 訊號路徑為對照組，期望能達成找出選擇性調控 β -類澱粉蛋白生成路徑卻不影響 γ -secretase 於其他細胞生理功能之目標。

實驗設計

本次實驗使用轉殖表現 ATP6V0d1 基因作為實驗方式以研究 ATP6V0d1 對 γ -secretase 活性之影響，HEK 細胞分別表現 γ -secretase 之受質 human C99-GAL4 與 mouse Notch Δ E-GAL4，經過 γ -secretase 切割後產生 AICD-GAL4 與 NICD-GAL4，實驗採西方墨點法與 Luciferase 報導基因兩種方法測定 γ -secretase 之活性。

研究材料



1. 細胞培養(cell culture) 品名

	廠商
DMSO	Sigma
Fetal Bovine Serum	GIBCO
DMEM	GIBCO
Trypsin EDTA 10x	GIBCO
Hygromycin B	Invitrogen
Zeocin	Invitrogen
Blasticidin HCl	Invitrogen
G418	Invitrogen
Pen-Strep Ampho Soluion	Biological industries
Tetracycline	Sigma
10cm 培養皿	BD Falcon
6 孔式培養皿	UNI

2. 細胞株

本實驗所使用之細胞為轉殖 GAL4 -driven Luciferase 報導基因之 HEK 細胞，其表現 humanC99-GAL4 與 mouse NΔE -GAL4 將於後文中稱之為 C99 細胞與 NG 細胞。

3. 酵素品名

	廠商
Phusion Hight-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Restriction Endonucleases <i>Nde I</i>	New England Biolab
Restriction Endonucleases <i>EcoR I</i>	New England Biolab

4. 試劑品名

	廠商
dNTP	Promega

Bafilomycin A1
 Rapamycin
 Pierce BCA protein Assay Kit
 Immobilon Western HRP substrate
 Lysosensor Yellow/Blue dextran
 Lipofectamine 2000™ Reagent
 Monensin
 Nigercin
 4-morpholineethanesulfonic acid (MES)
 Protease Inhibitor Cocktail Set
 Passive Lysis Buffer, 5X
 50X Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer
 Western blot stripping reagent
 Paraformaldehyde
 SYBR Safe DNA gel stain

5. Maker 品名

BIO-100 DNA Ladder
 PageRuler™ prestained protein marker

6. DNA 品名

pcDNA5
 ATP6V0d1-HIS
 pEGFP-C1

7. 抗體品名

GAPDH
 6E10
 mouse anti HIS
 LAMP2
 Cleaved Notch1 (Val1744) Rabbit mAb
 Notch1
 Nicastrin
 ATP6V0d1
 GAL4
 Anti Mouse IgG (HRP)
 Anti Goat IgG (HRP)

Calbiochem
 Sigma
 Thermo Scientific
 Millipore
 Invitrogen
 Invitrogen
 Invitrogen
 Molecular Probes
 Sigma
 Calbiochem
 Promega
 Omics Bio
 T-PRO
 EMS
 Invitrogen

廠商

Fermentas
 Bioman

廠商

Invitrogen
 王柏堅學長構築
 Clonotech

廠商

Santa Cruz
 Covance
 ANOGEN
 Santa Cruz
 Cell Singling
 Santa Cruz
 Santa Cruz
 Abcam
 Santa Cruz
 Santa Cruz
 Santa Cruz



Anti Rabbit IgG (HRP)

Santa Cruz

Alexa Fluor 633 F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Mouse IgG (H+L)

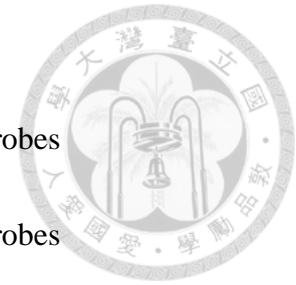
Molecular Probes

Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody

Molecular Probes

Alexa Fluor 488 Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)

Molecular Probes



8. 緩衝液

Blocking Buffer 40ml

2g Anchor nonfat milk

40ml TBST

Phosphate-buffered saline (PBS)

80g NaCl

2g KCl

2g KH₂PO₄

溶於一公升 ddH₂O 中

SDS sample buffer, 6X

7ml 4X Tris Cl/SDS, pH6.8

3ml glycerol

1g SDS

0.93g DTT

1.2mg Bromphenol blue

加 ddH₂O 至 10ml

4X Tris-HCl/SDS, pH6.8, 500ml

30.25g Tris base

2g SDS

ddH₂O



4X Tris-HCl/SDS, pH8.8, 500ml

91g Tris base

2g SDS

ddH₂O

10X Tris-Glycine SDS running buffer

29g Tris-base

144g Glycine

10g SDS

加 ddH₂O 至 1L

25X Tris-Glycine transfer buffer

36.4g Tris-base

180g Glycine

加 ddH₂O 至 1L

MES buffer

5mM NaCl

115mM KCl

1.3mM MgSO₄

25mM MES

調整至 pH4-7.5

Cell lysis buffer

50mM Tris-HCl

150mM NaCl

25mM β-glycerophosphate

1mM Na₃VO₄

2mM EDTA

使用前加入 1% Triton X100 與 Protease Inhibitor Cocktail Set
Tris-buffered saline with TEEN-20 (TBST)

2.42g Tris-base

8g NaCl

pH7.6

使用前加入 0.1% TWEEN-20

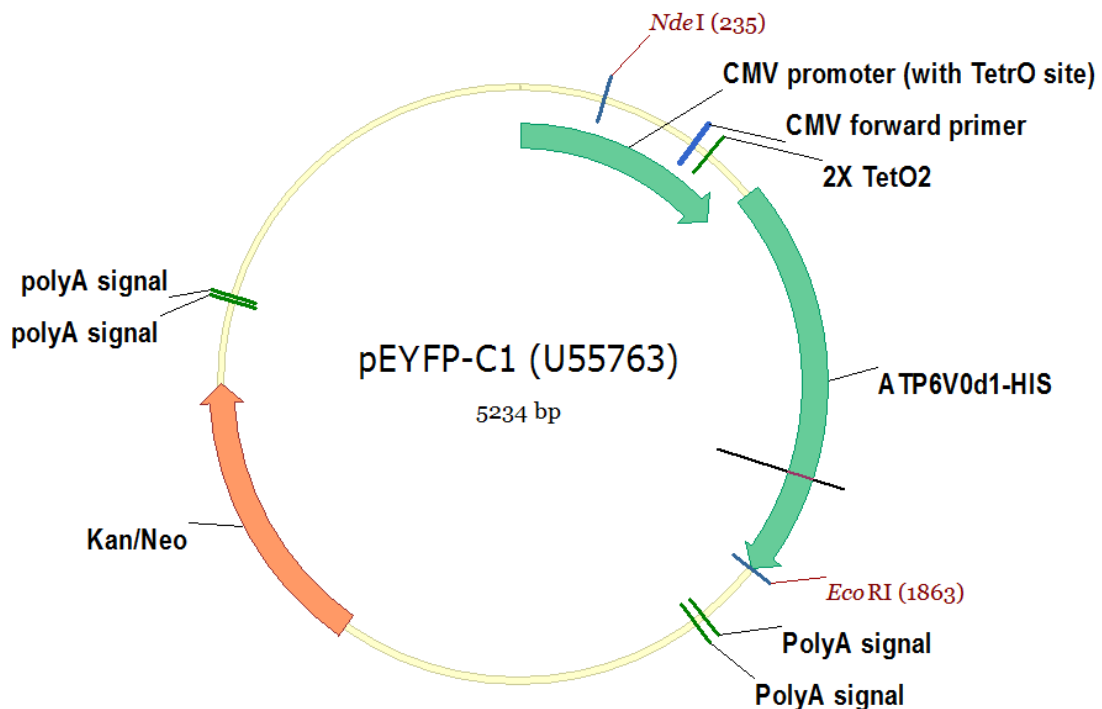


研究方法



質體 DNA 設計

ATP6V0d1-HIS 基因以 PCR 放大後連接上帶有 CMV-tetracycline operator 之啟動子，以 pEYFP-C1 質體為骨架設計攜帶 ATP6V0d1 基因之質體，選擇質體上之 NdeI 與 EcoRI 限制酶切位切除後接上帶有 CMV-tetracycline operator 啟動子之 ATP6V0d1-HIS 基因以製作可受 tetracycline 調控表現之質體，其選殖抗生素為 G418。



冷凍細胞解凍

將冷凍小管從液態氮保存設備中取出，以 37°C 水浴槽讓細胞些微解凍後倒入內含 15ml 培養液之 50ml 離心管內，以 2900×g 離心 10 分鐘。吸除培養液後以新鮮培養液小心的將離心管底部細胞團塊沖散後放入已裝有培養液之 10 公分培養皿中，放置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱中。

細胞繼代

在新培養皿中加入 10ml 新培養液，以真空抽氣幫浦吸除原培養皿中之舊培養液，

以 5mlPBS 洗滌細胞後再吸除，加入 1ml 之 Trypsin-EDTA 溶液並輕微搖晃培養皿後加入 1ml 培養液將細胞自培養皿底部沖離，細胞均勻分散後，計算所需之細胞數量後放入新的培養皿中，放置於 37°C、5%CO₂ 之培養箱中。



ATP6V0D1 質體轉殖與穩定細胞株製作

於轉殖前一日將 4×10^5 細胞培養於培養皿中 24 小時。取兩支 1.5ml 之微量離心管，其一將 1 μ g 質體 DNA 加入 Opti-MEM 中，另一管則加入 10 μ l 之 Lipofectamine 2000 轉殖試劑，靜置 5 分鐘後將兩管內容物混和靜置 30 分鐘後加入培養皿中散布均勻，4 小時後除去舊培養液更換含有選殖抗生素之新鮮培養液持續培養至可供細胞繼代之細胞數量。細胞繼代時將所收集之細胞以一百倍體積稀釋後放入新的培養皿中培養，待細胞於培養皿底面長成小群落時以 200 μ l-tip 將群落挑起置於 200 μ l 培養液之 96 孔培養盤內，待其長滿後置換到 6 孔培養盤內，長滿後則繼代至 10 公分培養盤內，再以西方墨點法驗證轉殖之蛋白質表現正常。


蛋白質濃度測定

細胞樣品之蛋白質濃度測定使用 Thermo Scientific Pierce BCA protein Assay Kit 依據廠商所提供之建議指示操作。測定前先以 BSA 調配標準蛋白溶液，濃度分別為 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μ g/ml 取 10 μ l 放置於 96 孔微量分析盤中，將待測物稀釋 5 倍成總體積 10 μ l 後放置於 96 孔微量分析盤中，以 50:1 比例混和 Assay Kit 中 A 與 B 劑後以每一孔 200 μ l 體積加入微量分析盤中，放置於 37°C 中反應 30 分鐘，之後測定其 562nm 之吸收光。

西方墨點法

細胞收集與樣本製作

將細胞培養於六孔式培養皿中，待細胞長滿培養皿之底部後按照實驗需要將細胞



分別以 1 μ g/ml tetracycline、1 μ g/ml DMSO、10 μ M DAPT 處理 24 小時與 200 μ M Bafilomycin A1 處理 1 小時後準備收集。將六孔式培養皿置於冰上保冷，以真空幫浦吸去孔內之培養基，每一孔以 1ml PBS 將細胞自培養皿底面沖下，裝入 1.5ml 離心管中，於 4 $^{\circ}$ C 狀態下以 2900 \times g 離心 5 分鐘後吸除上清液保留底部之細胞團塊。於離心管中加入 50 μ l 之 lysis buffer 後於冰上靜置 1 小時後以 16000 \times g 離心 10 分鐘，收集上清液即為細胞質溶液樣本，保存於 -80 $^{\circ}$ C 狀態。

膠體電泳樣本製作

將保存於 -80 $^{\circ}$ C 之細胞質溶液樣本於冰上緩慢解凍後使用 BCA 反應進行總蛋白質濃度測定，過程按照製造商所提供之表準操作步驟進行，樣本濃度定量後每一離心管分別吸取 30 μ g 之蛋白質，以二次水調整至相同體積並加入 6X sample dye，以 100 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘。

電泳與轉漬

設定 250V 電壓、每一膠片 20mA 電流進行電泳 90 分鐘，將膠片取出，貼上 PVDF 膜後夾於濾紙中間，置入轉漬操作台中，倒入 transfer buffer 後以 250V 電壓、360mA 電流進行轉漬 1 小時，轉漬完成後將 PVDF 膜置於塑膠容器中，浸泡於 10ml 之 blocking buffer 中搖晃 30 分鐘，之後加入所選定之一級抗體，抗體之稀釋比例為 1:5000，並置於水平搖盪台上，於 4 $^{\circ}$ C 狀態下反應隔夜。

倒除 blocking buffer，將 PVDF 膜以 TBST buffer 每次 5 分鐘方式清洗三次後再以 10ml TBST buffer 浸泡並加入二級抗體，抗體之稀釋比例為 1:5000，置於搖盪台上反應 1 小時，隨後再以 TBST buffer 清洗三次每次 5 分鐘，之後將 PVDF 膜置於一空培養皿內，以 Millipore Immobilon Western HRP substrate 充分混和 A 與 B 劑後倒於 PVDF 膜上，再以 UVP 系統偵測冷光反應訊號強度。



Lysosome pH 值測定

將細胞培養於白色 96 孔之微量分析盤中，並分別給予 1 μ g/ml tetracycline、1 μ g/ml DMSO 處理 24 小時與 200 μ M Bafilomycin A1 處理 1 小時後於培養基中加入 10 μ g/ml Lysosensor 於培養箱中靜置 30 分鐘，之後倒除分析盤中之培養基並加入 pH6.5 之 MES buffer，靜置兩分鐘後以 335nm 波長激發並測量其 452nm (E452)與 521nm (E521)發射光強度，並計算其 E521:E452 比值，再以校正曲線公式計算出 pH 值。

pH 值校正曲線


將細胞培養於白色 96 孔之微量分析盤中，並給予 1 μ g/ml tetracycline、1 μ g/ml DMSO 處理 24 小時之後於培養基中加入 10 μ g/ml Lysosensor 於培養箱中靜置 30 分鐘，之後倒除分析盤中之培養基並加入不同 pH 值之 MES buffer 100 μ l 與 10 μ M Monensin 和 10 μ M Nigericin，其 pH 值依序為 4、4.5、5、6、7、7.5，靜置兩分鐘後以 335nm 波長激發測量其 452nm (E452)與 521nm (E521)發射光強度，並計算其 E521:E452 比值與 MES buffer 酸鹼值繪製 pH 值校正曲線。

Luciferase assay

將細胞培養於白色 96 孔之微量分析盤中，並分別給予 1 μ g/ml tetracycline、1 μ g/ml DMSO 處理 24 小時與 200 μ M Bafilomycin A1 處理 1 小時之後將培養液倒除，加入 20 μ l 之 1X Passive lysis buffer 充分混和後置於水平搖盪台於 4 $^{\circ}$ C 狀態下搖盪 45 分鐘後，加入 20 μ l luciferase 受質靜置反應 5 分鐘再使用 Perkin Elmer 1420 Luminescence Counter 偵測其冷光。

細胞免疫染色

於六孔式培養皿中放入蓋玻片，加入 2ml 培養基與 8×10^4 細胞培養 24 小時後加入



1 μ g/ml tetracycline，經過 24 小時吸除培養基，加入 1ml 4% paraformaldehyde 處理 30 分鐘固定細胞，以 PBS 清洗兩次後加入 1ml 0.5% Triton X-100/PBS 處理 15 分鐘，以 PBS 清洗兩次後加入 1ml BSA/PBS 處理 30 分鐘後進行免疫染色。染色使用一級抗體為 anti-ATP6V0d1 (1:250)、anti-NCT (1:250)、anti-LAMP2 (1:250)於室溫下處理兩小時，以 PBS 清洗兩次後加入二級抗體 goat anti-mouse IgG (1:500)、donkey anti-goat IgG (1:500)、goat anti-rabbit IgG (1:1000)於常溫下處理一小時，以 PBS 清洗兩次後加入 DAPI 染劑處理 15 分鐘，以 PBS 清洗兩次後於在玻片滴上 10 μ l Glycerol/PBS 將蓋玻片蓋上，再以 Leica TCS-SP5 MP 共軛焦顯微鏡 63X 物鏡觀察樣品。

數據處理與統計

實驗數據統計以對照組為基準以百分比方式呈現各組別間數據之比較，所有實驗數據之顯著性則以 Student's t test 統計方式檢驗。

研究結果

ATP6V0d1 對 γ -secretase 之活性影響之實驗結果


為了瞭解 ATP6V0d1 對 γ -secretase 活性之影響，在此以 HEK 細胞株分別表現 γ -secretase 之受質 C99-GAL4 與 Notch Δ E-GAL4 並以 Western blot 偵測此二受質蛋白之表現量，以代表 γ -secretase 之活性。實驗結果顯示，於表現 Notch Δ E-GAL4 之細胞株中，表現 ATP6V0d1 造成 NICD 之蛋白質表現量顯著下降為對照組的 $29\pm 20\%$ ，(圖一， $n=5$ ， $p<0.001$)，顯示 ATP6V0d1 對 γ -secretase 切割 Notch Δ E-GAL4 之活性產生抑制之作用，在表現 C99-GAL4 之細胞株中表現 ATP6V0d1 對 C99-GAL4 之蛋白質表現量亦顯著下降為對照組的 $52\pm 26\%$ ，(圖二， $n=6$ ， $p<0.01$)，顯示其能夠增強 γ -secretase 切割 C99-GAL4 之活性而造成 C99-GAL4 蛋白質表現量之減少。

以 DAPT 抑制 γ -secretase 活性與以 Bafilomycin A1 抑制細胞內 V-ATPase 活性之結果顯示於 C99 細胞株中此二種藥物之處理皆可造成 C99-GAL4 之蛋白質表現量顯著之上升(圖三， $n=5$ ， $p<0.01$)，而於 NG 細胞株中則可造成 NICD 表現量顯著下降(圖四， $n=4$ ， $p<0.01$)，並且在實驗組與對照組中無顯著差異，顯示此二種藥物處理皆能完全掩蓋表現 ATP6V0d1 所造成之影響。

此一階段之實驗結果顯示，表現 ATP6V0d1 將造成 C99-GAL4 與 NICD-GAL4 之表現量下降，並且因為使用 V-ATPase 抑制劑處理可消除此現象，推測其作用可能與 V-ATPase 之活性有關。

溶小體酸鹼值測定實驗之結果

近年之研究證據支持 ATP6V0d1 次單元參與 V-ATPase 之酵素活性(Tsuyoshi et al. 2003; Bauerle et al. 1993)，而因 V-ATPase 主要表現於溶小體(Lysosome)，而其功能係溶小體之酸化，故推測表現其次單元將會對 V-ATPase 活性產生影響，進而影響溶小體之酸鹼值，故在此以對酸鹼值敏感之染劑 LysoSensor 進行細胞內溶小體之



染色以測量其酸鹼值。溶小體酸鹼值以 Lysosensor 螢光比值對校正曲線求得之酸鹼值結果顯示在表現 ATP6V0d1 基因之狀態下 C99 與 NG 細胞株之溶小體酸鹼值皆有顯著之下降，C99 組別 pH 值下降為對照組之 $93.87 \pm 0.56\%$ ， $p < 0.001$ ，而 NG 組別 pH 值下降為對照組之 $90.73 \pm 1.36\%$ ， $p < 0.001$ (圖五；圖六)，並且雖然未達統計顯著，細胞在以 Bafilomycin A1 處理下溶小體之酸鹼值皆有上升之趨勢。此一實驗結果顯示表現 ATP6V0d1 基因對於 V-ATPase 活性具有增強之影響，而提高了其酸化溶小體之效率，造成溶小體酸鹼值顯著之降低。

Luciferase 報導基因之實驗結果

本實驗設計之 Luciferase 報導基因由被切割後之 γ -secretase 受質胞內端 AICD-GAL4 與 NICD-GAL4 所驅動而表現，故可假設以 Luciferase 受質反應後偵測其冷光訊號強度與 γ -secretase 之活性呈現正相關性，此報導基因之實驗結果中 C99 細胞株對照組與表現 ATP6V0d1 基因之 Luciferase 冷光訊號並無顯著之差異，而以 DAPT 與 Bafilomycin A1 處理下冷光訊號強度下降(圖七)；而在 NG 細胞株內則可觀察到表現 ATP6V0d1 基因之組別冷光訊號顯著上升為對照組之 2.37 倍，同時以 DAPT 與 Bafilomycin A1 處理下皆可降低訊號強度(圖八)。

此一階段實驗結果顯示表現 ATP6V0d1 基因會顯著增強 NICD-GAL4 所驅動之 Luciferase 基因表現，但並不會顯著影響 AICD-GAL4 所驅動之 Luciferase 基因表現。此一實驗中 NICD-GAL4 之增強結果可能是因為 Notch 訊號需要 V-ATPase 活性之緣故，故增強 V-ATPase 活性導致了 NICD-GAL4 訊號之增強。

免疫螢光染色實驗結果

為進一步了解不同蛋白質於細胞中之交互作用之可能與位置，以免疫染色法觀察細胞內 ATP6V0d1、NCT 與 LAMP2(Lysosome-associated membrane protein 2)於細胞內之分布位置，結果顯示 C99 細胞株中 ATP6V0d1 與 NCT 於細胞中具重疊之分


布，同時亦與 LAMP2 具重疊分布(附圖一)，顯示其於細胞中可能之交互作用；NG 細胞株中，則可觀察到 ATP6V0d1 與 NCT 於細胞中具重疊之分布，但是與 LAMP2 卻無重疊之分布(附圖二)，顯示其可能具不同之作用機制。



討論與結論

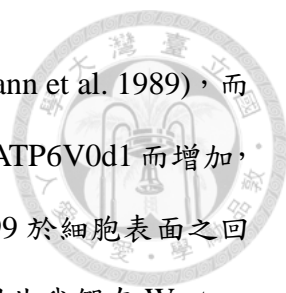
首先讓我們重整個實驗之結果，從本次的研究結果顯示 ATP6V0d1 對於 γ -secretase 之活性具有選擇性的影響，在 Western blot 實驗中我們在表現 ATP6V0d1 與 γ -secretase 受質之細胞株中可發現 γ -secretase 對於 N Δ E 之切割作用受到 ATP6V0d1 表現之抑制(圖一)，而其對於 C99-GAL4 之切割作用卻有著增強之效果(圖二)；但是在 Luciferase 報導基因之實驗中卻呈現不同之結果，其結果顯示 γ -secretase 對於 N Δ E-GAL4 之切割活性顯著的上升(圖八)但是在 C99-GAL4 之切割作用卻無顯著改變(圖七)，而同時我們檢驗可能受到表現 ATP6V0d1 所影響之溶小體，發現其有明顯之酸化情形(圖五；圖六)。

為什麼會產生如此之差異？而我們又該如何對這樣的結果作出解釋？因為本研究內容可大致區分成兩條不同之路徑，所以我們個別討論。而先以前人研究較多之 Notch 路徑著手，從實驗結果中我們可以明顯的發現 Western blot 實驗與 Luciferase 報導基因實驗結果互相抵觸，即 Western blot 實驗中代表 Notch 路徑活性之 NICD-GAL4 表現量之顯著下降與 Luciferase 報導基因實驗中受 NICD-GAL4 調控之 luciferase 表現量顯著上升，面對這樣相互矛盾的結果，我們勢必進一步考慮實驗設計背後之意義與參考其他人之研究結果以下結論。從 Western blot 實驗中可以發現 γ -secretase 受質之表現量發生了改變，但這是否直接代表了 γ -secretase 之活性，在假設人為表現之情況下受質蛋白質最初之表現量不變，則最終於 Western blot 被抗體辨識之蛋白質則已經於細胞中經過了不同的修飾、切割、分泌、運送等等之過程，而這其中大部分之過程或多或少有 V-ATPase 參與其中，考量 V-ATPase 酸化胞器之功能足以影響其運輸、分泌或是胞器內酵素之活性，而我們也確實在實



驗中觀察到表現 ATP6V0d1 增強了溶小體(lysosome)之酸化程度，而如此酸化程度之改變是否也可能造成實驗中所觀察到之結果。有研究指出 Notch 路徑之正常功能需要仰賴 V-ATPase 之正常活性(Thomas et al. 2010; Yan et al. 2009)，如果抑制 V-ATPase 之活性將會造成 Notch 路徑無法正確表現其下游基因，我們在 Western blot 實驗中觀察到表現 ATP6V0d1 增強了 V-ATPase 之活性，同時亦觀察到 Notch 訊息路徑中之 NICD-GAL4 表現量減少，NICD 進入細胞核中調控下游基因之表現，所以當 NICD 減少時代表 Notch 訊息路徑之功能是受到抑制的，但是在 Luciferase 報導基因實驗中我們卻可以看到 Luciferase 訊號顯著之上升，能代表 Notch 下游功能並未受到抑制，即 NICD-GAL4 能夠正常的轉移至核內驅動 Luciferase 基因表現，只是在 Western blot 實驗上所觀察到之 NICD-GAL4 表現量減少了。而從前人的研究中， γ -secretase 降解 Notch 的反應是會被 V-ATPase 的功能影響(Valapala et al. 2013)。配合本次之研究可以推論，在表現 ATP6V0d1 之狀況下，因強化了溶小體之酸化反應而提升了其對 Notch 之降解功能，並同時促進了 Notch 下游路徑之活化。NICD 很難在核內被偵測到(Lubman et al., 2007)，可能是因為其帶有 PEST 序列而能加速其在細胞內之分解(Fryer et al., 2004; Tsunematsu et al., 2004)，從這樣的角度可以推測 ATP6V0d1 之表現對 γ -secretase 切割 N Δ E 之活性為促進功能，而 Western blot 中所見之表現量下降原因乃因為 NICD-GAL4 被快速的分解所導致，如此亦能驗證前人之研究，同時我們亦觀察到 ATP6V0d1 與 NCT 於細胞內重疊分布之情形(附圖二)。

而在 γ -secretase 切割 C99-GAL4 之路徑上我們可以從 Western blot 實驗中觀察到 C99-GAL4 表現量之減少(圖二)，但是在 Luciferase 報導基因實驗中卻無法顯示出差異(圖七)，這個部分可能需要從數個部分著手來探討，首先 C99 與 APP 於細胞中可能表現於內質網、高基氏體、細胞膜、內噬體與溶小體(Haass et al. 1992a; Lai et al. 1995; Marquez-Sterling et al. 1997)，並且這樣的位置表現為動態的，故 C99 經常在細胞內各處移動，當 C99 表現在內噬體與溶小體時部分可能會被 γ -secretase



切割，而部分則會經由非 γ -secretase 調控之機制而水解(Weidemann et al. 1989)，而我們可以從 Lysosensor 實驗中觀察到 V-ATPase 之活性受到表現 ATP6V0d1 而增加，綜合前人所研究之 V-ATPase 功能而言，這樣的改變可能造成 C99 於細胞表面之回收量增加、分解量增加或是直接的影響了 γ -secretase 之活性，因此我們在 Western blot 上觀察到 C99-GAL4 表現量下降卻無法於 Luciferase 報導基因實驗中得到同樣之結果。同時當我們以 γ -secretase 抑制劑 DAPT 與 V-ATPase 抑制劑 Bafilomycin A1 處理時卻可以看到相似之效果，意即 C99-GAL4 表現量上升與 NICD-GAL4 表現量下降(圖三、圖四)，我們已能預料 DAPT 抑制 γ -secretase 活性將會造成如此之結果，但何以抑制 V-ATPase 之活性會產生同樣之結果，Bafilomycin A1 在細胞中為 V-ATPase 抑制劑，之前所提到之多篇研究已證實其能抑制 Notch 路徑表現，於本研究中我們也可以在 Luciferase 報導基因實驗中觀察到冷光訊號之下降，而同樣的訊號下降亦發生於表現 C99-GAL4 之 C99 細胞株，這樣的結果可能顯示了 Bafilomycin A1 透過抑制 V-ATPase 而對 γ -secretase 產生抑制作用。而我們亦觀察到 ATP6V0d1 與 NCT、LAMP2 於細胞內之重疊分布(附圖一)，顯示此交互作用可能發生於溶小體中，此一現象並無其他相關之研究，故值得進一步的研究。

為了進一步證實可能之作用機轉，未來之實驗內容須針對假設一一做出解答，必須確認表現 ATP6V0d1 對 V-ATPase 之整體功能是否尚有其他之影響，同時能夠更加精確的追蹤細胞中 V-ATPase、 γ -secretase 與其受質蛋白之表現位置、運輸分泌與降解過程，在 amyloidogenic 路徑中，專注於 γ -secretase 受質 C99 於細胞內之表現動態，與 AICD 對於其下游基因之調控能力使否受到表現 ATP6V0d1 而影響，我們可以更進一步檢視其路徑所產生之 β -類澱粉蛋白是否有種類上之改變，因 γ -secretase 所產生之 β -類澱粉蛋白具有不同之胺基酸長度，其中又以 42 個胺基酸長度之片段被認為具有較高之細胞毒性與致病能力(Haass and Selkoe 2007)，此一部份亦是需要仔細確認的。而在 Notch 路徑中，則需要進一步了解 NICD 於細胞中之轉移分佈與其降解過程，以了解何以 NICD 表現量於細胞質中下降但是報導基

因訊號卻顯著上升。有鑑於 V-ATPase 與 γ -secretase 在細胞內皆參與廣泛之功能，表現 ATP6V0d1 於細胞內之影響相信是全面且多元的。

因此，本研究之結論為 ATP6V0d1 對 γ -secretase 活性之影響具有選擇性，其對於 N Δ E-GAL4 之切割作用受到 ATP6V0d1 表現而促進，可能是透過增強 V-ATPase 活性而達成此一影響，這一點可由前人之研究而推測，故透過直接抑制 γ -secretase 活性或是抑制 V-ATPase 活性可以消除此一影響亦與前人之研究相符合；而對於 C99 之切割作用卻有相較之下更為複雜之影響，於 Western blot 實驗中觀察到 C99-GAL4 表現量增加與無顯著差異之 Luciferase 報導基因實驗呈現不一致之結果，合理之解釋乃表現 ATP6V0d1 可能增強了溶小體降解蛋白質之能力而增強 C99-GAL4 非 γ -secretase 路徑之分解效率，同時亦影響了 γ -secretase 活性之雙重功效下而造成此一結果。

而因為 V-ATPase 所參與之細胞生理層面相當廣泛，如果想要確認其影響 γ -secretase 活性之路徑與方法則尚需要更進一步之實驗方可達成，在此希望本實驗能夠為後來之研究人員提供一些想法與線索，而在未來之實驗上達到實質之幫助，亦期待能夠早日發現 γ -secretase 其精密之調控路徑，以助於阿茲海默症治療藥物之開發，提升病患生活品質與降低照護負擔。

參考文獻



- Alzheimer's Association. 2008. 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 4. 110-133.
- Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, et al. 2005.Reductions in β -amyloid concentrations in vivo by the γ -secretase inhibitors BMS-289948 and BMS-299897. *Biochem Pharmacol.*69(4):689–698.
- Anraku Y, Umemoto N, Hirata R, Ohya Y. 1992. Genetic and cell biological aspects of the yeast vacuolar H^+ -ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 24:395–406.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 284(5415):770-6.
- Bauerle C, Ho MN, Lindorfer MA, Stevens TH. 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H^+ -ATPase membrane sector. *J Biol Chem.* 268:12749–12757.
- Busciglio J Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. 1993.Generation of beta-amyloid in the secretory pathway inneuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci.* 90:2092–2096.
- Busciglio J, Pelsman A, Wong C, et al. 2002. Altered metabolism of the amyloid betaprecursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron.* 33:677-88.



- Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. 1994. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem.* 269:21–24.
- DeStrooper B, Annaert W, Cupers P, et al. 1999. A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature.* 398(6727):518–522.
- Dries DR, Yu G. 2008. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 5: 132–146.
- Dries DR, Shah S, Han YH, Yu C, Yu S, Shearman MS, Yu G. 2009. GLU333 of nicastrin directly participates in gamma-secretase activity. *J Biol Chem.* 284: 29714–29724.
- Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikke K, Leong SL, Perez K, Johanssen T, Greenough MA, et al. 2010. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 142: 857–867.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. 2003. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol.* 5(5): 486-8.
- Faller P. 2009. Copper and zinc binding to amyloid- β : Coordination, dynamics, aggregation, reactivity and metalion transfer. *Chembiochem.* 10: 2837–2845.
- Forgac M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and



pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:917–929.

Fryer CJ, White JB, Jones KA. 2004. Mastermind recruits CyeC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell.* 16:509-20.

Haapasalo A, Kovacs DM. 2011. The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase. *J Alzheimers Dis.* 25(1):3-28.

Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 101–112.

Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. 1992a. Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: Alternative processing into β -amyloid-bearing fragments. *Nature.* 357: 500–503.

Haass C, Scholssmacher M, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski B, Liederburg I, Koo F, Schenk D, Teplow D, et al. 1992b. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 359: 322–325.

Hasegawa H, Sanjo N, Chen F, Gu YJ, Shier C, Petit A, Kawarai T, Katayama T, Schmidt SD, Mathews PM, et al. 2004. Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J Biol Chem.* 279:46455–46463.

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. 2003. Alzheimer disease in



the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.*

60:1119-22.

Hemming ML, Elias JE, Gygi SP, Selkoe DJ. 2008. Proteomic profiling of g-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol.* 6: e257.

Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. 2007. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology.* 68:326- 37.


Iwata M, Imamura H, Stambouli E, Ikeda C, Tamakoshi M, Nagata K, Makyio H, Hankamer B, Barber J, Yoshida M, Yokoyama K, Iwata S. 2004. Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:59–64.

Kaether C, Haass C, Steiner H. 2006. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis.* 3: 275–283.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer’s disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325: 733–736.

Klionsky DJ, Nelson H, Nelson N. 1992. Compartment acidification is required for efficient sorting of proteins to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 267:3416–3422

Lai A, Sisodia SS, Trowbridge IS. 1995. Characterization of sorting signals in the

- 
- beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 270: 3565–3573.
- LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ. 2003. Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem.* 278: 37213–37222.
- Levitan D, Greenwald I. 1995. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature.* 377: 351–354.
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. 2009. Soluble oligomers of amyloid b protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron.* 62: 788–801.
- Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. 2006. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci.* 7(2):93-102.
- Lubman OY, Ilagan MX, Kopan R, Barrick D. 2007. Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. *J Mol Biol.* 365:577-89.
- Marquez-Sterling NR, Lo ACY, Sisodia SS, Koo EH. 1997. Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: Evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling. *J Neurosci.* 17: 140–151.
- McCarthy JV, Twomey C, Wujek P. 2009. Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and g-secretase activity. *Cell Mol Life Sci.* 66:



1534–1555.

Moriyama Y, Madea M, Futai M. 1992. The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems. *J Exp Biol.* 172:171–178.

Nixon RA. 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.* 120: 4081–4091.

Numoto N, Kita A, Miki K. 2004. Structure of the C subunit of V-type ATPase from *Thermus thermophilus* at 1.85 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60:810–815.

Pasternak SH, Callahan JW, Mahuran DJ. 2004. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: Reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alzheimers Dis.* 6: 53–65.

Prokop S, Shirotani K, Edbauer D, Haass C, Steiner H. 2004. Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem.* 279: 23255–23261.

Querfurth HW, LaFerla FM. 2010. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 362: 329–44

Relini A, Cavalleri O, Rolandi R, Gliozzi A. 2009. The two fold aspect of the interplay of amyloidogenic proteins with lipid membranes. *Chem Phys Lipids.* 158: 1–9.

Sahagian GG, Novikoff, PM. 1994. *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias I, Boyer



J, Fausto N, Jakoby W, Schachter D, Shafritz D, eds) 3rd Ed, 275–291. Raven Press, New York.

Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81:741-66.

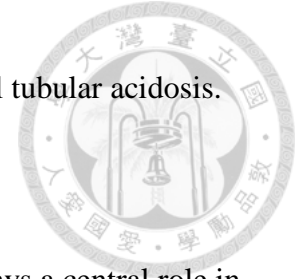
Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* doi: 10.1101/cshperspect. a006189.

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature.* 359: 325–327.

Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE 3rd, Sudhof T, Yu G. 2005. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell.* 122: 435–447.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor- dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 27: 2866– 2875.

Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. 2002. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d



subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis.

Gene. 297:169–177.

Smith AN, Richard WF, Sara LS, Fiona EK. 2008. The d subunit plays a central role in human vacuolar H⁺-ATPases. J Bioenerg Biomembr. 40:371-383.

Steiner H, Fluhrer R, Haass C. 2008. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. J Biol Chem. 283: 29627–29631.

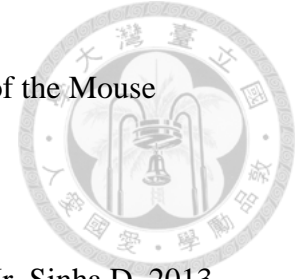
Stevens TH, Forgac M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. Annu Rev Cell Dev Biol. 13:779–808.

Tanzi RE, Bertram L. 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. Cell. 120(4):545-55.

Thaker YR, Roessle M, Gruber G. 2007. The boxing glove shape of subunit d of the yeast V-ATPase in solution and the importance of disulfide formation for folding of this protein. J Bioenerg Biomembr. 39:275–289.

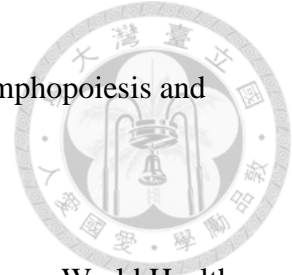
Thomas V, Serena D, Katia C, Carlo T, David B. 2010. The vacuolar ATPase is required for physiological as well as pathological activation of the Notch receptor. Development. 137:1825-1832.

Tsunematsu R, Nakayama K, Oike Y, Nishiyama M, Ishida N, Hatakeyama S, et al. Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. J Biol Chem. 2004: 279:9417-23.



- Tsuyoshi N, Shoko KN, Forgac M. 2003. Expression and Function of the Mouse V-ATPase d Subunit Isoforms. *JBiolChem.* 278:46396-46402.
- Valapala M, Hose S, Gongora C, Dong L, Wawrousek E, Zigler JS Jr, Sinha D. 2013. Impaired endolysosomal function disrupts Notch signaling in optic nerve astrocytes. *Nat Commun.* 4: 1629.
- Wakabayashi T, Craessaerts K, Bammens L, Bentahir M, Borgions F, Herdewijn P, Staes A, Timmerman E, Vandekerckhove J, Rubinstein E, Boucheix C, Gevaert K, De Strooper B. 2009. Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat Cell Biol.* 11: 1340-6.
- Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 57: 115–126.
- White JM. 1992. Membrane fusion. *Science.* 258: 917-924.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature.* 398: 513–517.
- Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ, et al. 2004. Chronic treatment with the g-secretase inhibitor

LY-411,575 inhibits b-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem.* 279: 12876–12882.



World Health Organization. *Dementia: A Public Health Priority*. Geneva: World Health

Organization. 2012. Available from:

http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf. Accessed

November 9, 2012.

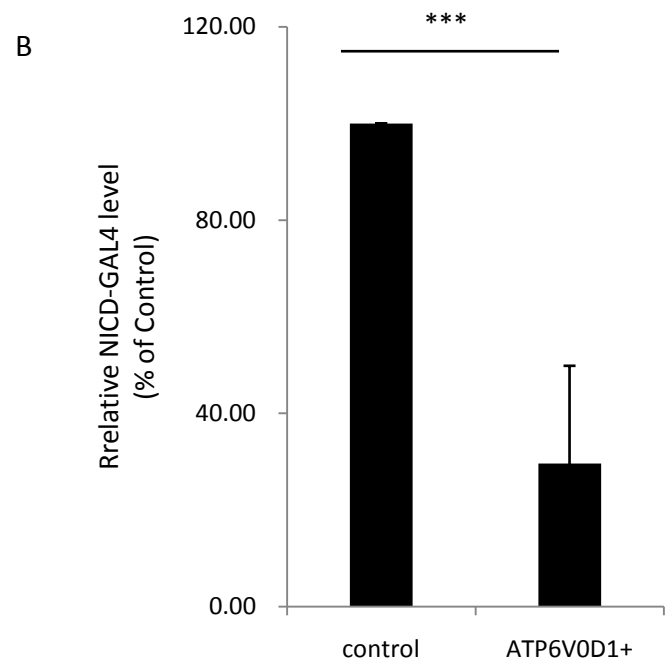
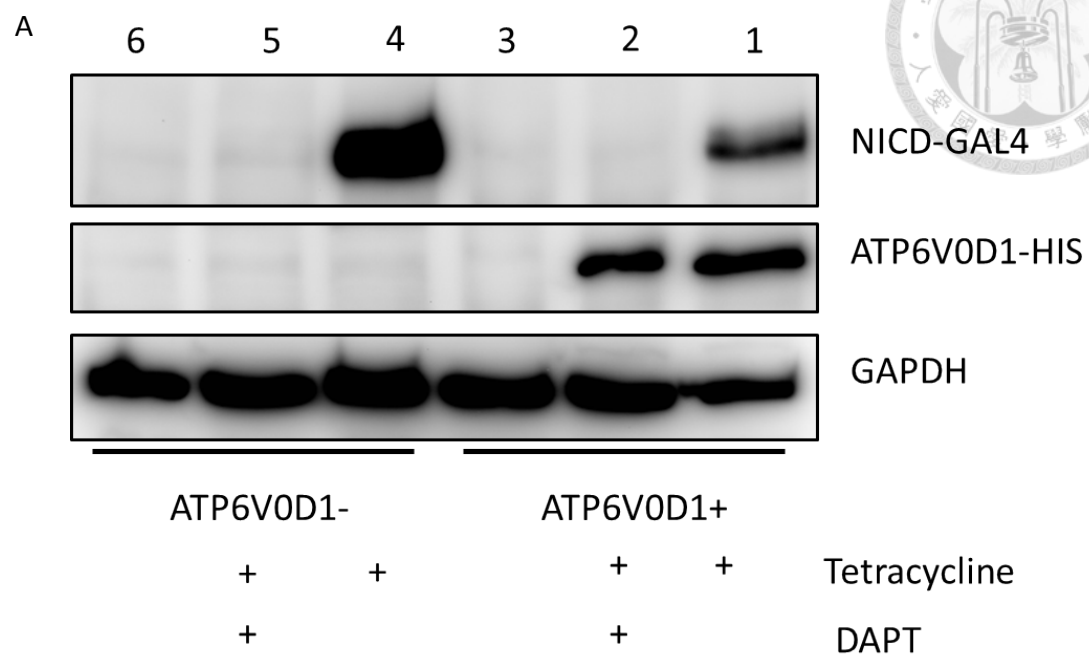
Yan Y, Natalie D, Trudi S. 2009. The vacuolar proton pump (V-ATPase) is required for

Notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell.* 17(3):

387–402.



圖一

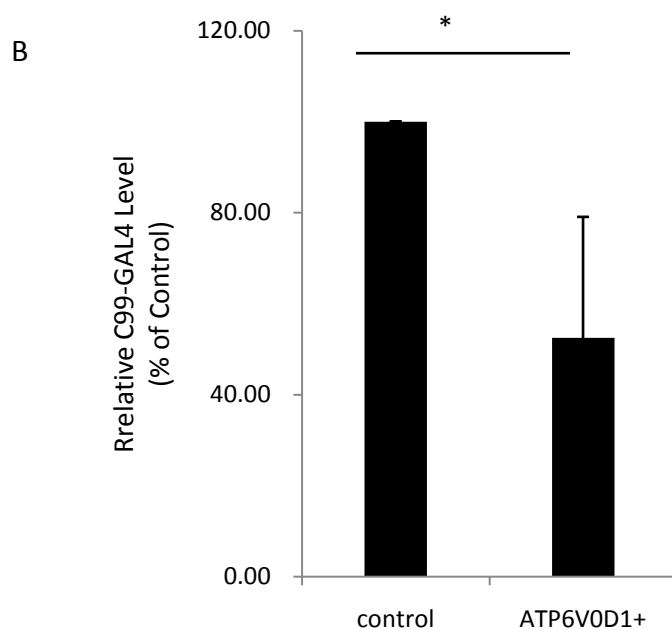
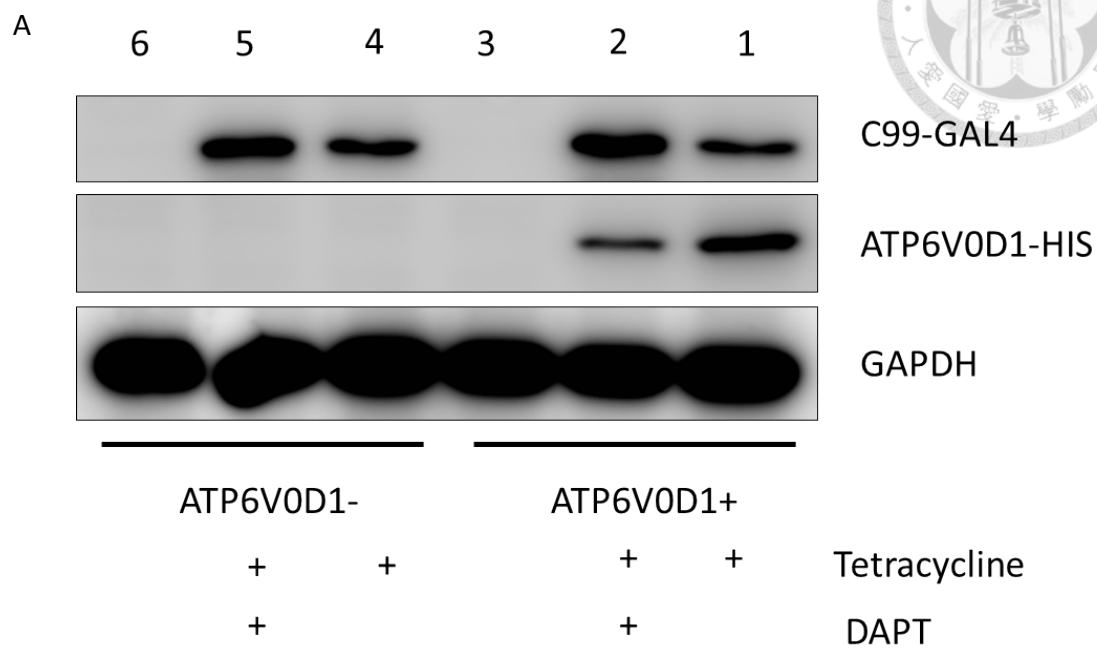


圖一. NG 細胞株中 ATP6V0d1 對於 γ -secretase 活性之影響

A)代表 γ -secretase 活性之 NICD-GAL4 之 Western 實驗結果 B)ATP6V0d1 overexpression 組別(lane 1)與對照組(lane 4)之 NICD-GAL4 量化統計結果，NICD-GAL4 表現量顯著下降。(n=5, $p < 0.0001$)



圖二

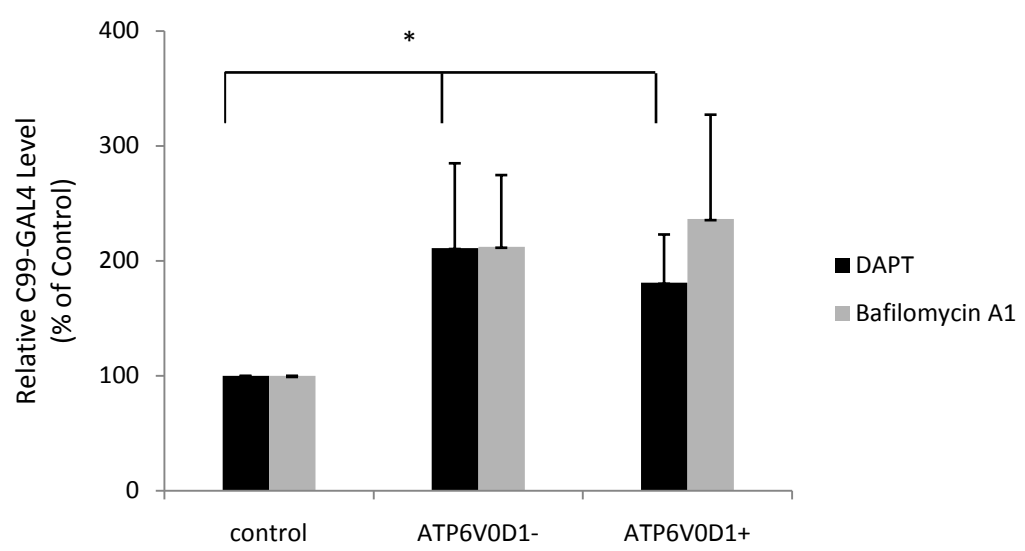
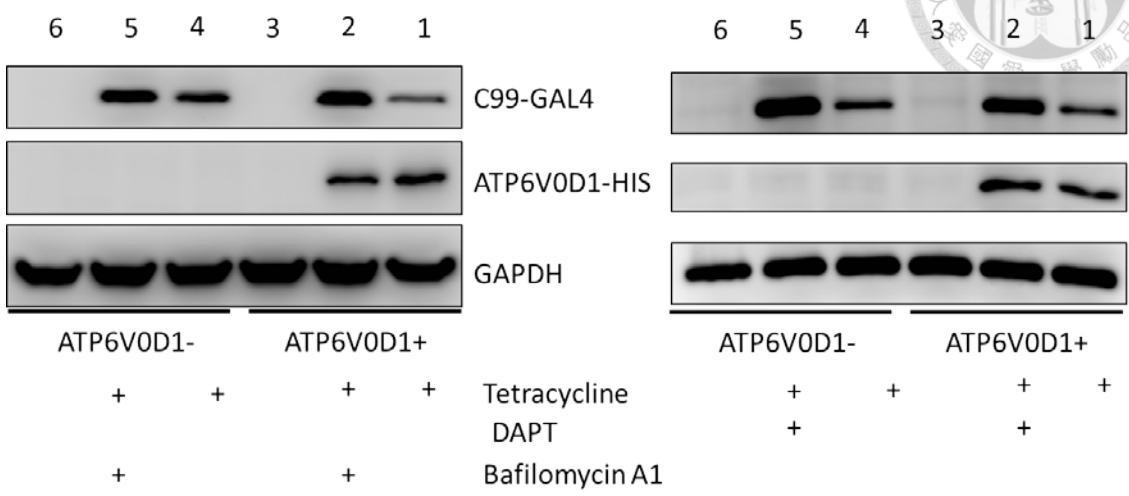


圖二. C99 細胞株中 ATP6V0d1 對於 γ -secretase 活性之影響

A) 代表 γ -secretase 活性之 C99-GAL4 之 Western 實驗 B)ATP6V0d1 overexpression 組別(lane 1)與對照組(lane 4)之 C99-GAL4 量化統計結果，C99-GAL4 表現量顯著下降。(n=5, $p < 0.01$)



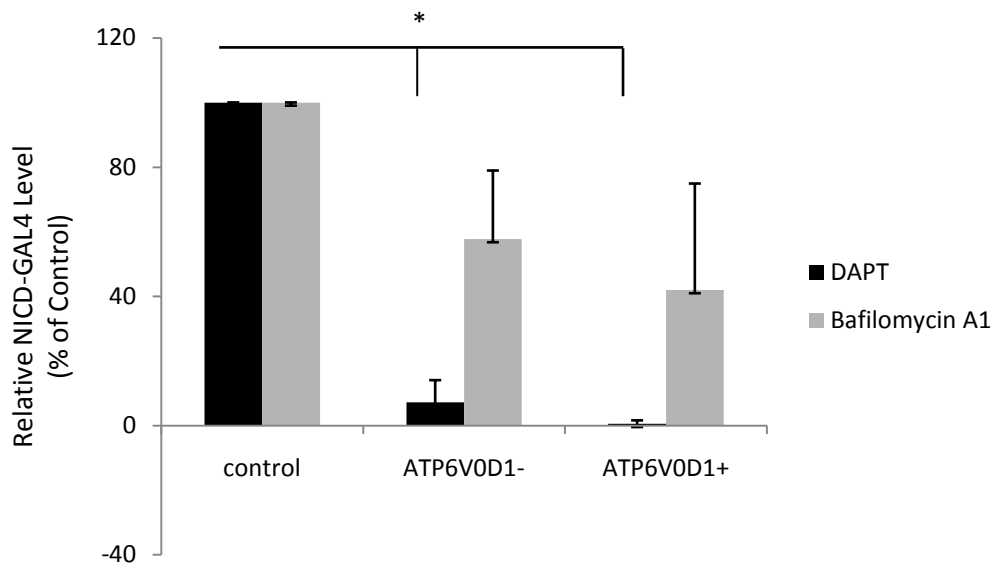
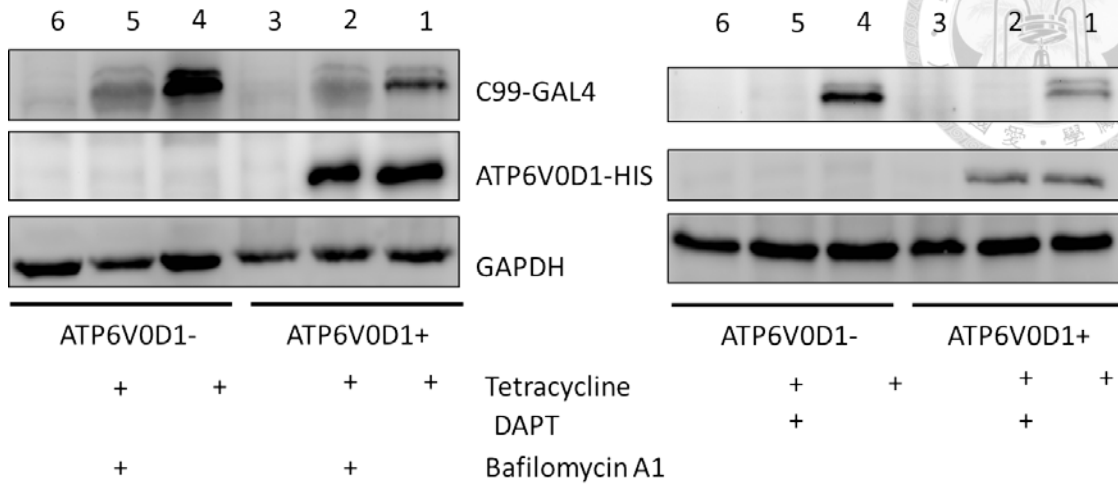
圖三



圖三. 抑制劑處理 C99 細胞株對於 γ -secretase 活性之影響

以 DAPT 與 Bafilomycin A1 處理後(lane 2, 5)與對照組(lane 4)之 C99-GAL4 量化統計結果，C99-GAL4 表現量顯著上升(n=5, $p < 0.01$)。

圖四

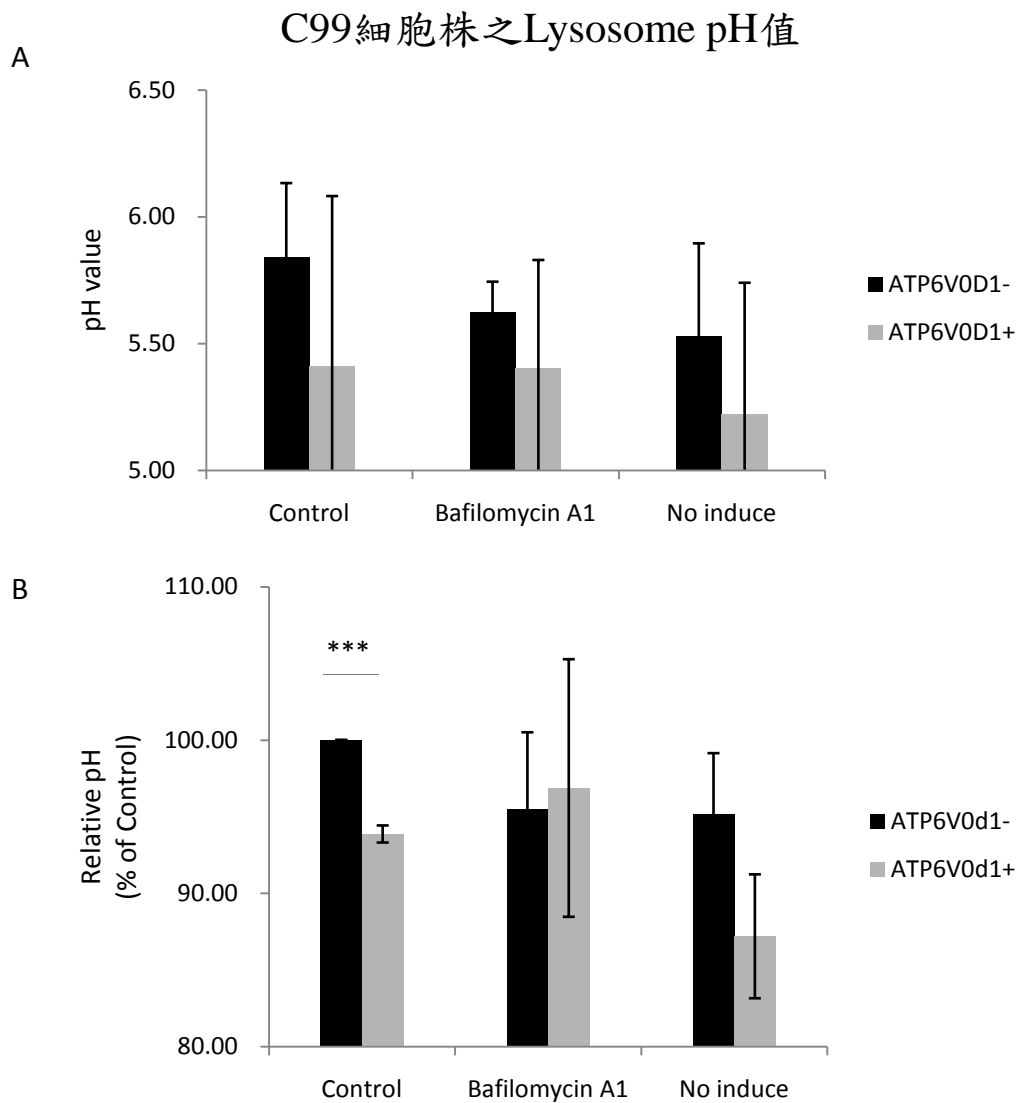


圖四. 抑制劑處理 NG 細胞株對於 γ -secretase 活性之影響

以 DAPT 與 Bafilomycin A1 處理後(lane 2, 5)與對照組(lane 4)之 NICD-GAL4 量化統計結果，NICD-GAL4 表現量顯著下降(n=4, $p < 0.01$)。



圖五

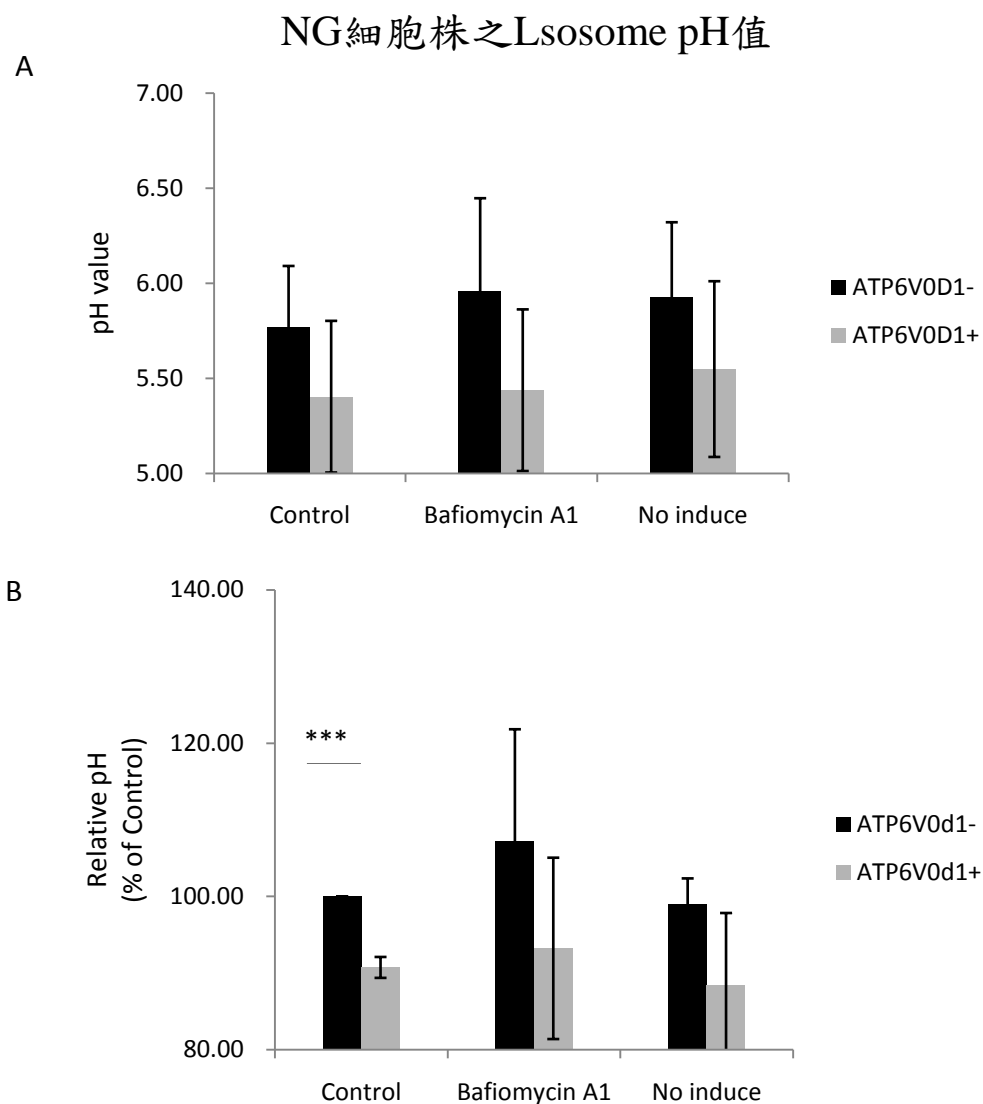


圖五. C99 細胞株 Lysosome 酸鹼值實驗結果

A)ATP6V0d1 overexpression 組別與對照組之 Lysosome 酸鹼值變化。B)以對照組為基準計算酸鹼值差異百分比作圖，可發現表現 ATP6V0d1 造成 pH 值之顯著下降 (n=4, $p<0.001$)。



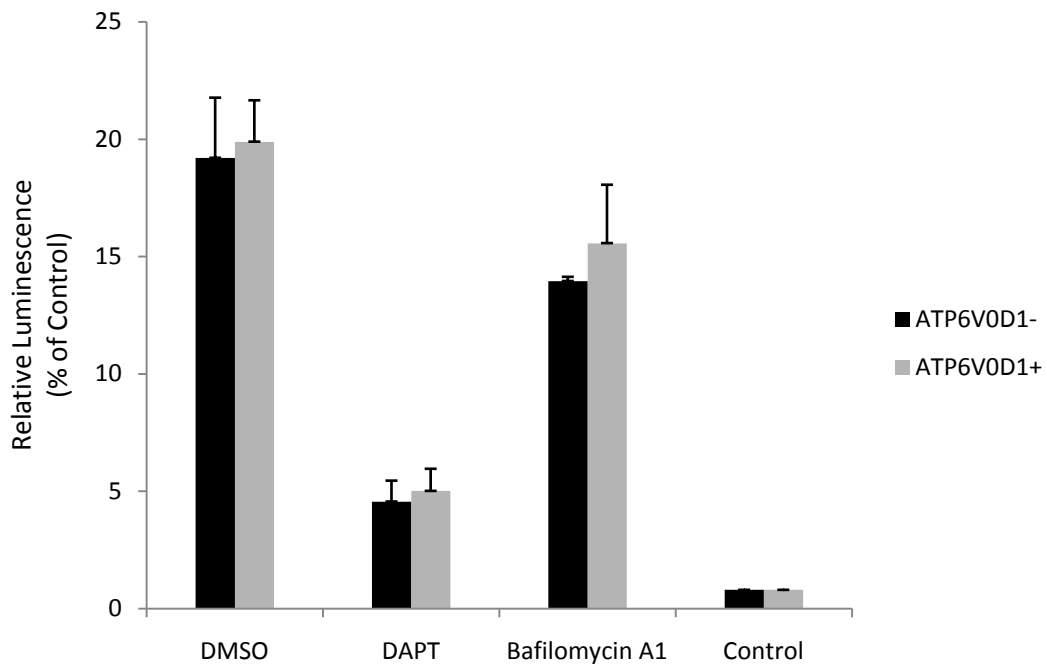
圖六



圖六. NG 細胞株 Lysosome 酸鹼值實驗結果

A) ATP6V0d1 overexpression 組別與對照組之 Lysosome 酸鹼值變化。B) 以對照組為基準計算酸鹼值差異百分比作圖，可發現表現 ATP6V0d1 造成 pH 值之顯著下降 ($n=3, p<0.001$)。

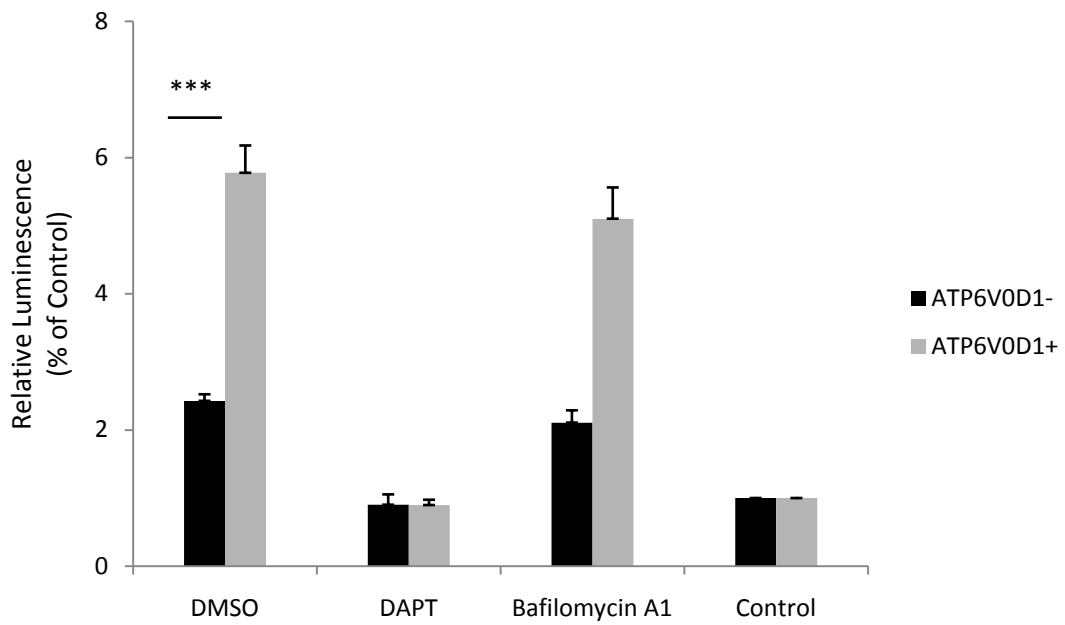
圖七



圖七. C99 細胞株 γ -secretase 活性之 Luciferase 報導基因實驗結果

ATP6V0d1 overexpression 組別與對照組之 Luciferase 冷光訊號量化結果，以背景值 (-) 為基準之倍數表示方法，結果並無顯著差異。

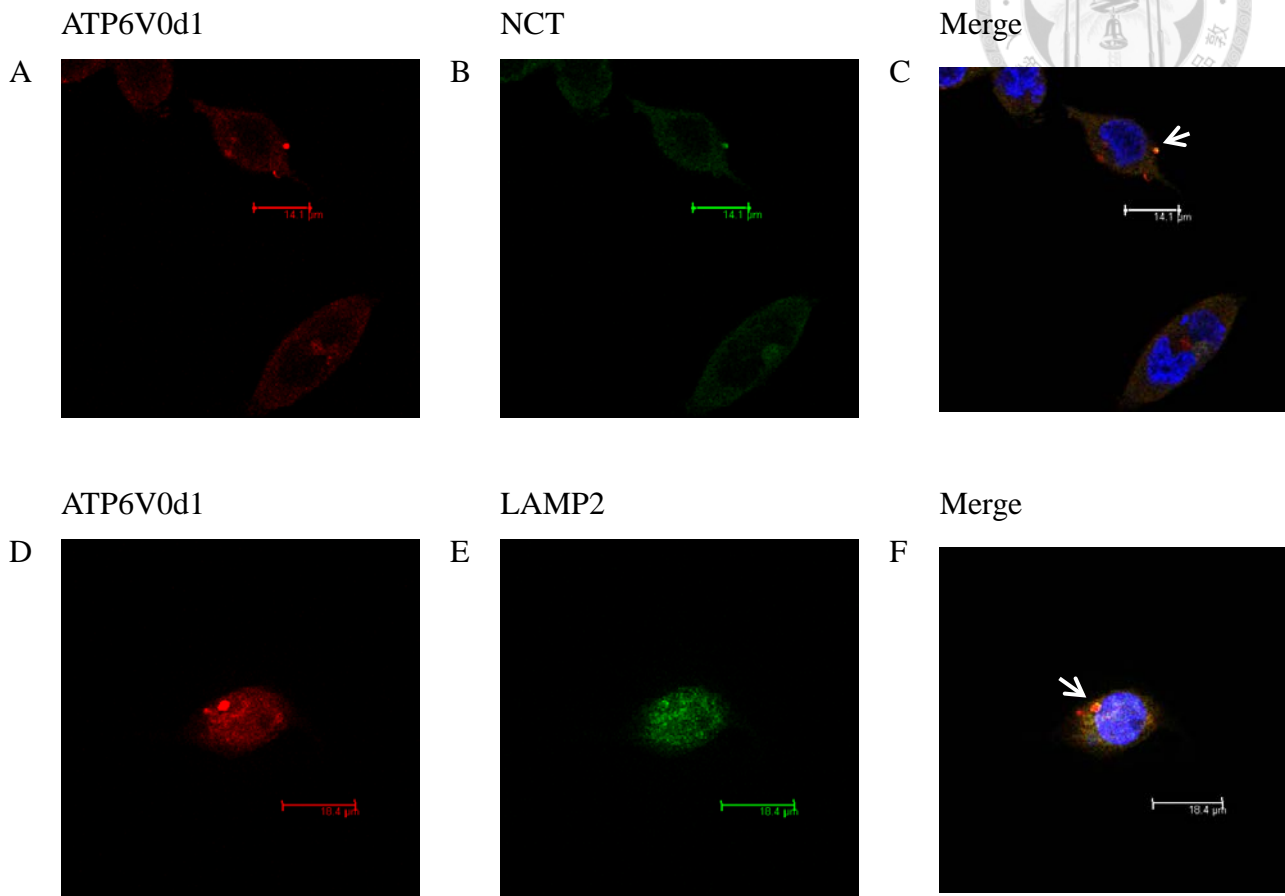
圖八



圖八. NG 細胞株 γ -secretase 活性之 Luciferase 報導基因實驗結果

ATP6V0d1 overexpression 組別與對照組之 Luciferase 冷光訊號量化結果，以背景值 (-) 為基準之倍數表示方法，表現 ATP6V0d1 造成 Luciferase 冷光訊號顯著上升。(n=3, $p<0.0001$)

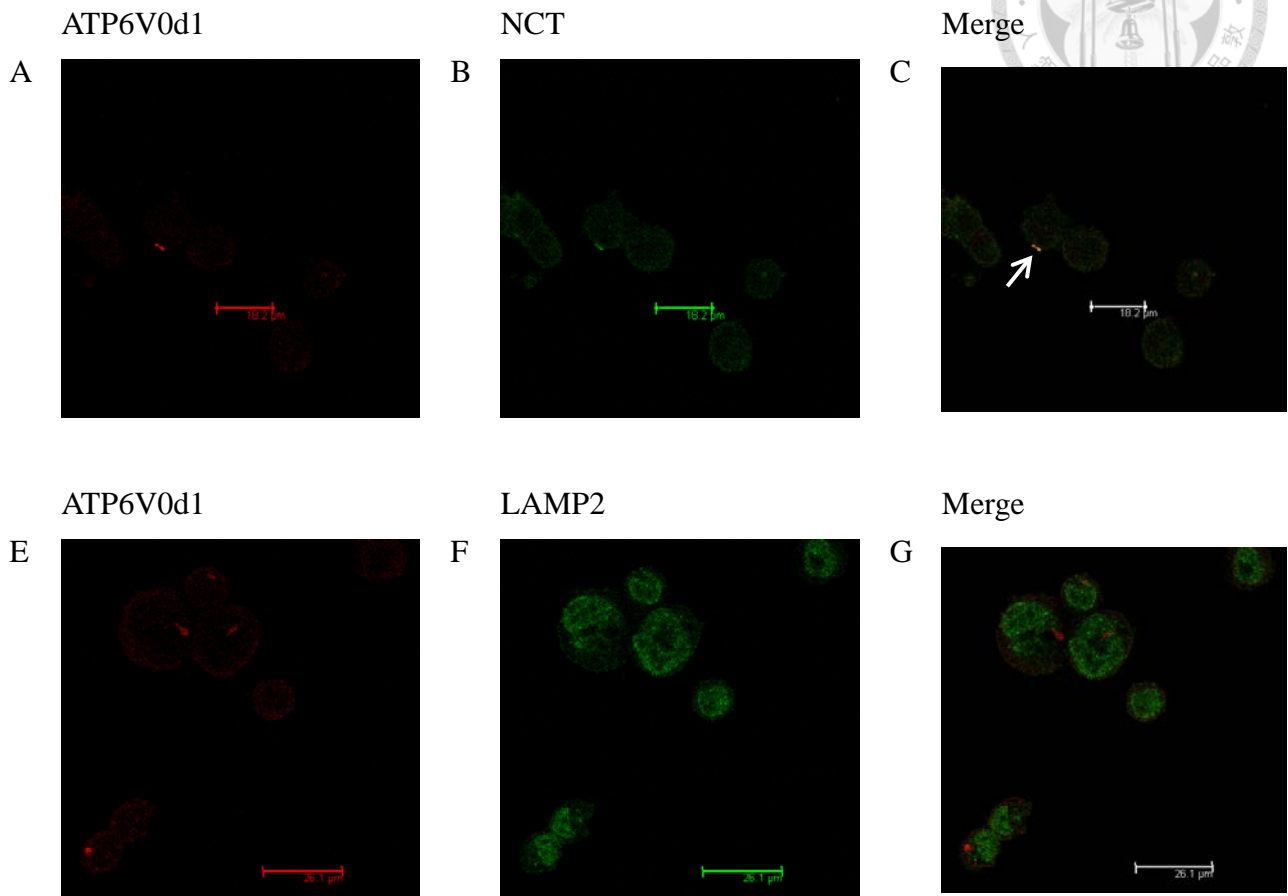
附圖一



附圖一. C99 細胞株免疫螢光染色實驗結果

C99 以免疫螢光染色觀察蛋白質分布情形，A、D)細胞以 ATP6V0d1 抗體染色(紅)。B)細胞以 NCT 抗體染色(綠)。E)細胞以 LAMP2 抗體染色(綠)。C)ATP6V0d1 與 NCT 於細胞內分布具有重疊之情形(白色箭頭處)。F) ATP6V0d1 與 LAMP2 於細胞內分布具有重疊之情形(白色箭頭處)

附圖二



附圖二. NG 細胞株免疫螢光染色實驗結果

NG 以免疫螢光染色觀察蛋白質分布情形，A、D)細胞以 ATP6V0d1 抗體染色(紅)。B)細胞以 NCT 抗體染色(綠)。E)細胞以 LAMP2 抗體染色(綠)。C)ATP6V0d1 與 NCT 於細胞內分布具有重疊之情形(白色箭頭處)。F) ATP6V0d1 與 LAMP2 於細胞內分布無重疊之情形。