

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 次單元 V₀d1 調節細胞自噬作用

對類澱粉前驅蛋白恆定之影響

The Role of Vacuolar ATPase Subunit V₀d1 in

Modulating Autophagic Clearance of Amyloid

Precursor Protein C-terminal Fragments in

Alzheimer's Disease

周儒筠

Ju-Yun Chou

指導教授：廖永豐 博士

Advisor : Yung-Feng Liao, Ph. D.

中華民國 107 年 7 月

July, 2018



誌謝

雖然中間經歷了休學和換實驗室，但十分開心我還是能夠在預期的時間內順利完成畢業論文，並拿到碩士學位。過程中得到了很多人的幫助，也收到很多鼓勵和體諒，都是讓我繼續堅持的動力來源，真的非常感謝。

在進入實驗室之前，我主要感興趣並選修的課程大多是生態、遺傳相關的學科，即使在休學的一年中稍稍接觸了一些阿茲海默氏症的研究，其實還是對神經科學比較沒有那麼熟悉，也沒有太多細胞實驗相關的經歷，很感謝我的指導教授廖永豐教授，願意給我機會進入實驗室學習，並在這段時間內，每次當我遇到困境的時候給予我指引，幫我解決很多實驗上遇到的困難和疑惑。也謝謝教授在我進度遲滯或實驗結果不符預期的時候不會給我壓力，而是讓我能夠慢慢的、一步一步地把實驗完成並與我一起分析可能的原因，指引我可以轉換的方向。

感謝口試委員黃偉邦教授和易玲輝教授，給予許多寶貴的建議和指導，讓我知道我還有許多可以更加強的部分，也讓我的論文能有一個更適當的架構和更完整的內容。

感謝沛翊學長、Noopur、韻文學姐、育慈學姐、柏帆學長、秉易學長、子瑄和 Mati 給予的幫助，和在偶爾苦悶、疲憊時給予的歡笑和零食支持。特別感謝在我剛進實驗室時教我做實驗的 Noopur，謝謝她不介意我的破英文，總是用簡單易懂的單字和語法，非常認真確實的教導我許多實驗的重點、細節，甚至是數學計算等等。也很謝謝坐在我旁邊的子瑄，總是有很多話題可以聊，讓我常保好心情。

最要感謝的是我的爸媽和妹妹，謝謝他們總是作為我最棒的依靠，在讀書或做實驗累的時候給我放鬆的環境，在我假日到實驗室時偶爾很貼心地特地來接我回家，在我心情不好時無聲地陪伴或安慰，謝謝家人們一直以來的包容和支持，讓我能無後顧之憂地專注完成學業。

中文摘要

位於大腦額葉皮層及海馬迴中的 β 類澱粉斑塊是阿茲海默氏症患者的典型病理特徵之一，而 β 類澱粉蛋白由類澱粉前驅蛋白(APP)經 β -secretase 和 γ -secretase 先後切割產生並被釋放至細胞外。當 β 類澱粉蛋白異常累積並聚集形成 β 類澱粉斑塊，會使腦內產生發炎反應並進一步引發神經纖維糾結的產生，導致神經細胞死亡、大腦萎縮等現象，最終造成阿茲海默氏症之神經退化性疾病。為了減少 β 類澱粉蛋白的產生，我們期望找到能調控 γ -secretase 酵素活性的目標蛋白質。藉由 RNA 干擾法篩選出三種對 γ -secretase 作用於 amyloidogenic 反應路徑相較 Notch 路徑有選擇性影響的 γ -secretase 結合蛋白，並針對與阿茲海默氏症之相關性尚未被探討過的 ATP6V0d1 蛋白做進一步的研究。藉由慢病毒將對 ATP6V0d1 有抑制作用的 shRNA 送入共同過量表現 APP-C99 和胞外片段剔除之 Notch 蛋白(N Δ E)的細胞株中，希望能確認 ATP6V0d1 蛋白確實具有調控 γ -secretase 的功能，且會選擇性地影響 γ -secretase 對 amyloidogenic 反應路徑的作用。當 ATP6V0d1 基因表現被削弱後，細胞內部的 APP-C99 及其 γ -secretase 切割產物—類澱粉前驅蛋白胞內片段(AICD)和 N Δ E 及其 γ -secretase 切割產物—Notch 蛋白胞內片段(NICD)都會同時大量累積，且 APP-C99 及 AICD 的累積倍數明顯多於 N Δ E 及 NICD 增加的趨勢，顯示 ATP6V0d1 的抑制對 γ -secretase 進行 amyloidogenic 反應路徑有較大影響。ATP6V0d1 是囊泡型 ATPase 的次單元之一，且已知囊泡型 ATPase 會協助溶酶體建立內部酸性環境，故推測抑制 ATP6V0d1 的表現可能會影響溶酶體內部酸鹼值，並間接影響細胞自噬作用的進行。在我們實驗中也發現，在 ATP6V0d1 表現量下降時，自噬作用受體蛋白 p62 的量和自噬作用標記蛋白 LC3-II/I 的比率皆有明顯的提升，顯示細胞自噬囊泡與溶酶體融合後，可能因酸鹼值改變而無法正常將蛋白質降解。這些研究結果證實，在抑制 ATP6V0d1 基因表現後，可能會藉由阻斷細胞自噬作用的進行，而顯著影響 γ -secretase 對 amyloidogenic 反應路徑的催化效率。這也顯示 ATP6V0d1 的存在對於細胞正常生理功能十分重要，且若此蛋白發生異常可能有潛在強化 amyloidogenic 反應路徑的風險。

關鍵詞：阿茲海默氏症、 β 類澱粉蛋白、ATP6V0d1、細胞自噬作用、自噬作用受體蛋白 p62、自噬作用標記蛋白 LC3、溶酶體酸鹼值

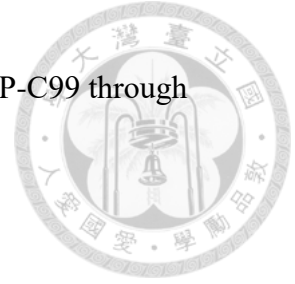




Abstract

The deposition of beta-amyloid plaques in cortex and hippocampus is one of the classical pathological features of Alzheimer's disease (AD). Amyloid precursor protein (APP) is cleaved by β -secretase and γ -secretase to produce amyloid- β ($A\beta$). Our RNA interference (RNAi) screening has led us to identify ATP6V0d1 as a potential γ -secretase modulator. ATP6V0d1 is a member of the γ -secretase interactome that consists of 57 distinct presenilin-1 (PS1)-binding proteins. We have demonstrated that down-regulation of ATP6V0d1 by RNAi could induce a significant reduction in γ -secretase activity. Using a HEK293-derived cell line (CCNY) that stably co-expresses yellow fluorescent protein (YFP)-tagged extracellular domain truncated Notch (N Δ E) and cyan fluorescent protein (CFP)-tagged APP-C99, we found that the levels of APP-C99, APP intracellular domain (AICD), N Δ E, and Notch intracellular domain (NICD) are significantly accumulated in response to downregulation of ATP6V0d1. Given that ATP6V0d1 is an integral component of the vacuolar H⁺-ATPase governing the maturation of autolysosomes, we examined the levels of p62 and LC3-I/II in CCNY cells that are subject to ATP6V0d1 knockdown. Our data showed that ATP6V0d1 knockdown effectively induces concomitant increases in the level of p62 and the ratio of LC3-II/LC3-I, suggesting that ATP6V0d1 knockdown could block the autophagic flux to induce concomitant accumulation of APP-C99 and N Δ E. Together, the present

findings suggest that ATP6V0d1 could modulate the clearance of APP-C99 through
controlling the maturation of autolysosome.



Keywords : Alzheimer's disease, Amyloid- β , ATP6V0d1, Autophagy, LC3, p62,

Lysosomal pH value.

目錄

誌謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
前言與研究背景.....	1
研究動機及目標.....	7
研究材料.....	8
研究方法.....	12
研究結果.....	18
討論.....	27
結論.....	30
參考文獻.....	31



圖片目錄

圖一、 分別在 HEK293 細胞株及 CCNY 細胞株中驗證抑制 ATP6V0d1 基因表現之效果。.....	41
圖二、 抑制 ATP6V0d1 基因表現後， γ -secretase 的受質及產物皆明顯累積。.....	43
圖三、 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，整體 YFP、CFP 和 LAMP1 的螢光訊號皆出現上升趨勢。.....	44
圖四、 細胞自噬作用的指標蛋白 LC3 及 p62 在抑制 ATP6V0d1 基因表現後皆明顯上升。.....	48
圖五、 在 HEK293 細胞株中抑制 ATP6V0d1 基因表現後，細胞自噬指標蛋白出現相似的上升趨勢。.....	49
圖六、 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，LC3 和 LAMP1 之螢光訊號有更明顯的共定位現象。.....	50
圖七、 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，溶酶體內部酸鹼度出現略微的上升趨勢。	51
圖八、 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，胞外 $A\beta_{40}$ 的濃度呈現下降趨勢。.....	52



前言與研究背景


阿茲海默氏症(Alzheimer's Disease)

1906年11月，德國精神病學家和神經解剖學家 Alois Alzheimer 首次提出一種大腦皮質層特有的嚴重疾病，描述一位表現出偏執、侵略及混亂等特性且具有漸進性睡眠及記憶障礙的患者，同時在這位患者死後的腦組織切片中發現了獨特的斑塊結構及神經纖維糾結，這個疾病後來被以這位學者的性命名，也就是現在十分為人所知的阿茲海默氏症 (Hippius and Neundörfer, 2003)。

隨著人均壽命上升，好發於人類老年之失智症對整體社會逐漸產生越來越大的影響，約有 500 萬美國人罹患阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)，且約每 66 秒就會產生一個新患者，在 2014 年美國官方死亡證明中紀錄有 9 萬多人死於阿茲海默氏症，使阿茲海默氏症成為美國 65 歲以上民眾的第六大死因。除了患者本身及其家庭飽受折磨，整體社會也在這個領域的研究中投入許多時間與金錢，預估直到 2018 年總花費可能高達 2700 億美元 (Alzheimer's, 2017; Wattmo et al., 2014; Wortmann, 2012)。

阿茲海默氏症是一種神經退化性疾病，患者腦部會發生神經細胞萎縮和神經元喪失及神經膠細胞增生等現象，且在海馬迴(Hippocampus)與額葉皮質(frontal cortex)有最為顯著的萎縮(Hippius and Neundörfer, 2003)。患者腦部組織切片中有細胞外的老年斑塊和神經纖維糾結(neurofibrillary tangles, NFT)，分別為 β 類澱粉異常累積並聚集而成的 β 類澱粉斑塊(β -amyloid plaques) (Glennner and Wong, 1984; Masters et al., 1985)和細胞內部因 Tau 蛋白過度磷酸化累積形成的神經纖維糾結 (Goedert et al., 1989)，這兩者為阿茲海默氏症的典型病理特徵。患者的記憶力、邏輯思考與語言表達能力、運動與行為能力等皆下降或完全喪失，因而造成日常生活遭受嚴重影響，且是失智症的常見原因之一，多數患者在確診後僅能繼續存活 5 到 10 年 (Kametani and Hasegawa, 2018; Rhodius-Meester et al., 2018)。


阿茲海默氏症的病因有許多不同說法，諸如 β 類澱粉蛋白假說(Amyloid Hypothesis, amyloid cascade hypothesis, $A\beta$ hypothesis)和 Tau 蛋白假說等 (Kametani



and Hasegawa, 2018)。β類澱粉蛋白假說內容為，在正常情況下，β和γ secretase 切割類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)所形成的β類澱粉蛋白會被釋放到細胞外並快速被降解或移除。但在老化或患病情況下，細胞代謝β類澱粉蛋白的能力變差而造成有越來越多β類澱粉蛋白累積並聚集，其中以Aβ₄₀和Aβ₄₂為主要組成，當具有疏水性的Aβ₄₂之總量或在所有β類澱粉蛋白中的比例上升時則易形成類澱粉蛋白纖維(amyloid fibril)，類澱粉蛋白纖維累積聚集成為β類澱粉斑塊，促使神經膠細胞增生等發炎反應，隨後引發氧化壓力和離子失衡，激酶與磷酸酶活性被改變後誘發 tau 蛋白過度磷酸化並形成神經纖維糾結，最終造成神經細胞死亡和神經退化性疾病的發生 (Haass and Selkoe, 2007; Kametani and Hasegawa, 2018; Selkoe and Hardy, 2016)。

目前市面上使用的阿茲海默氏症治療藥物有兩大類，分別是藉減少乙醯膽鹼分解而提升神經系統中神經傳導物質含量的乙醯膽鹼酶抑制劑 (Acetylcholinesterase inhibitor)及減緩 NMDA 受體受到過量刺激的 NMDA 受體拮抗劑(NMDAR antagonist) (Kim and Factora, 2018)，但這兩類藥物都僅有保留或改善認知功能並延遲疾病惡化的效果，而無法治癒阿茲海默氏症或促使損傷的神經再生，因此有越來越多研究針對阿茲海默氏症的病理特徵進行反向研究，旨在尋找可直接減少β類澱粉蛋白及過度磷酸化之 Tau 蛋白的途徑和藥物，在疾病的最初階段進行治療。

APP 是一種與神經細胞發育、神經突生長及軸突運輸相關的膜蛋白(Kang et al., 1987)，其水解可藉由 amyloidogenic 反應路徑或 nonamyloidogenic 反應路徑來進行，而β類澱粉蛋白(β-amyloid, Aβ)即為其 amyloidogenic 反應路徑中的產物，首先 β-secretase (BACE1) 會在膜外對 APP 進行切割，切割後較大的片段 sAPPβ會離開細胞膜，而仍在膜上的較小片段即為 APP-C99(或稱 βCTF)，這些 C99會進一步被膜上的γ-secretase 在其穿膜的部位切割，產生被留在細胞質中的 AICD 片段(APP




intracellular domain)和被釋放到膜外的 β 類澱粉蛋白， β 類澱粉蛋白在疾病狀態下會逐漸累積並聚集形成 β 類澱粉斑塊。另外，nonamyloidogenic 反應路徑中的 APP 則會先被一種稱為 α -secretase 的分泌酶切割，留下 C83 片段於膜上再被 γ -secretase 進行切割而產生 p3 蛋白及 AICD 片段 (Gertsik et al., 2014; Kaether and Haass, 2004)。

過往的研究始終未知 β 類澱粉蛋白在細胞中所扮演的正常生理功能，而只將之視為造成阿茲海默氏症的元凶之一，近期有部份研究指出這些 β 類澱粉蛋白或許在腦部免疫功能中扮演特定抗菌功能而並非完全的負面角色，故去除 β 類澱粉蛋白無法有效減緩知能喪失，甚至有可能提升感染風險 (Gosztyla et al., 2018; Kumar et al., 2016; Soscia et al., 2010)，但目前尚未能找到由此切入的治療策略，因此研究仍著重在過量累積的 β 類澱粉蛋白聚集對於神經細胞及神經系統造成的壓力和損害，故如何有效降低 β 類澱粉蛋白的過量製造和積累，以及如何有效清除異常聚集的 β 類澱粉蛋白仍是目前在阿茲海默氏症治療上被寄予厚望的途徑之一。

產生 β 類澱粉蛋白之 amyloidogenic 反應路徑中的要素之一— γ -secretase

γ -Secretase 在 β 類澱粉蛋白的產生途徑中扮演極重要的角色，過往研究指出這種分泌酶是一種由 4 個次單元所組成的膜蛋白 (Gertsik et al., 2015)，這些次單元分別為主要執行酵素水解功能的 presenilin (Capell et al., 1998; De Strooper et al., 1998)、負責進行受質挑選的 nicastrin (NCT) (Yu et al., 2000)、構成整個蛋白之初期骨架的 Anterior pharynx-defective 1 (APH-1) (Goutte et al., 2002; LaVoie et al., 2003) 以及協助穩定 presenilin 並促進其酵素活性的 Presenilin enhancer 2 (PEN-2) (Francis et al., 2002; Takasugi et al., 2003)，且這四個次單元對於 γ -secretase 的整體結構及功能而言都是必不可少的 (Edbauer et al., 2003)。目前阿茲海默氏症的藥物研究有許多不同方向，降低 β 類澱粉蛋白為其中一種，因此有許多藥物為了降低 β 類澱粉蛋白的產生而直接以抑制 γ -secretase 之功能作為治療手段，但 γ -secretase 還存在除 C99 蛋白之外的至少 90 種受質 (Haapasalo and Kovacs, 2011)，其中最廣為人知且備受討論的是 Notch 蛋白。在 Notch 水解途徑中，Notch 蛋白會先後被 α -secretase 和 γ -secretase



切割，留下 NICD 片段(Notch intracellular domain)，NICD 蛋白可進入細胞核中與轉錄因子 CSL 結合而影響基因表現，並藉此調控細胞週期、促進細胞增生及細胞存活等等，在細胞生理上扮演極重要的角色 (Gertsik et al., 2015; Wang et al., 2010)。因此這些藥物在降低β類澱粉蛋白產生的同時，極大程度上影響了其他原本應被γ-secretase 水解的受質而破壞細胞的正常生理功能，故在治療上有許多限制而無法達到預期的效果。這些不足的經驗昭示了在尋找γ-secretase 酵素功能的潛在抑制劑時，應盡可能降低其對γ-secretase 水解其他受質，尤其是 Notch 蛋白的影響，以避免過度干擾正常細胞生理功能。另外，有一些研究指出，γ-secretase 或許存在作為水解酵素以外的功能，故利用單一的手段抑制γ-secretase 活性並非治療的最佳選擇，而應該尋找可較專一抑制γ-secretase 在 APP 之 amyloidogenic 反應路徑上作用的抑制劑。

Presenilin 在γ-secretase 中為負責執行水解功能的次單元，故與之存在交互作用的蛋白質極有可能對γ-secretase 具潛在的調節功能而可能可被用於阿茲海默氏症的治療，故有研究透過 Tandem affinity purification (TAP)技術篩選出約 40 種與γ-secretase 具交互作用之蛋白質 (Wakabayashi et al., 2009)，為了進一步篩選出對 APP 之 amyloidogenic 反應路徑中的 C99 蛋白較有專一性的潛在目標，我們實驗室建立可分別過量表現 C99 蛋白的和 Notch 蛋白的兩種細胞株，用以研究在特定實驗處理後，γ-secretase 是否會對這兩種切割途徑造成不同的影響，並進一步針對上述約 40 種 presenilin 相關蛋白分別進行基因表現抑制，了解這些蛋白對γ-secretase 作用在 C99 蛋白和 Notch 蛋白之切割是否會有不同的影響 (Wang et al., 2017; Wang et al., 2018)，進而選出對γ-secretase 作用於 amyloidogenic 反應路徑影響較顯著的蛋白質。在這個實驗中，發現了三個潛在對 amyloidogenic 反應路徑影響較顯著的蛋白質，分別是 TMP21、VCP 和 ATP6V0d1，而前兩種蛋白質都已有與阿茲海默氏症相關的研究，因此我們將針對 ATP6V0d1 蛋白做後續的研究。



主要研究目標：ATP6V0d1

Vacuolar-type H^+ ATPase (V-ATPase) 是一種藉由水解 ATP 產生能量來主動運輸氫離子的氫離子幫浦，可將質子由膜外送入膜內而使細胞或胞器酸化，對胞內體(endosomes)、溶酶體(lysosomes)、分泌型囊泡(secretory vesicles)及高基氏體(Golgi apparatus)的酸化極為重要，且可藉由改變胞內酸鹼值來調控胞器內的酵素活性及蛋白質的降解、控制受器與其受質間的解離並可促進受質間的共同跨膜傳輸。另外，V-ATPase 還有一些新發現且與酸鹼值調控無關的功能，諸如感知環境的酸鹼值、協助膜與膜間的融合、作為蛋白質間交互作用的架橋以及協助胺基酸誘發 mTORC1 活化 (Maxson and Grinstein, 2014)。V-ATPase 由兩個部分組成，分別是由在膜外負責 ATP 水解的 V_1 domain 及在膜上負責運輸的 V_0 domain，而每個 domain 又由數個次單元蛋白所構成。 V_1 包含 8 種次單元蛋白，三個 V_1A 和三個 V_1B 一同組成水解酵素核心， V_1D 和 V_1F 形成中央旋轉軸心並在 ATP 水解時將氫離子往 V_0 方向送，三個 V_1E 和三個 V_1G 協助結構穩定， V_1C 和 V_1H 則負責調控整體功能；而 V_0 則包含 6 種次單元蛋白，a、c、c'、c''、d 和 e，c、c'、c'' 共同組成通道供氫離子通過並與 V_1 的中央轉軸連接，在 ATP 水解時整個結構連動旋轉，將質子由 V_0c 構成的通道送至 V_0a ，最終由 V_0a 送至膜內側 (Ferencz et al., 2017; Forgac, 2007)。

V-ATPase V_0 domain 的 d 次單元，大小約為 38kDa，人體中有兩種異構物普遍存在，分別是存在各種細胞中的 d1 次單元和僅表現於特定細胞如腎臟和骨骼細胞的 d2 次單元。之前篩選出來的目標蛋白質為 ATP6V0d1 蛋白，由 ATP6V0d1 基因轉譯而成，位於中央轉軸上 (Forgac, 2007)，參與調控 V_1 和 V_0 之間的連接且對 V-ATPase 旋轉機制有重要作用 (Smith et al., 2008)。另外，也有文獻指出其功能在於協助 V_1 domain 在膜上的穩定組合，或可能影響 V-ATPase 的整體運作，因此對質子運輸和 ATP 水解也極為重要 (Bauerle et al., 1993; Nishi et al., 2003)。




細胞自噬作用(Autophagy)

細胞自噬作用是細胞清除老舊及異常胞器、過度聚集或錯誤摺疊之蛋白質及入侵之微生物的途徑，細胞可藉由自噬作用達到回收有用或營養物質、維持細胞生理功能的目的。當細胞處於壓力之中，細胞自噬相關基因(Autophagy-related gene, Atg gene)會被啟動，進而促使內質網產生獨立且不閉合的雙層膜構造，這個被稱為吞噬泡(phagophore)的構造會逐漸增大並將異常的胞器或蛋白質包入其中，形成密閉的自噬小體(Autophagosome)，自噬小體會與內含許多水解酵素的溶酶體融合而形成自噬溶小體(Autolysosome)，這些內部的水解酵素會將自噬溶小體中的胞器和蛋白質分解為可被回收再利用的胺基酸及其他小分子物質 (Glick et al., 2010; Klionsky and Emr, 2000; Mizushima, 2007)。

在自噬作用中有兩個常用的指標蛋白，自噬作用標記蛋白 LC3 會嵌在逐漸增大的吞噬泡之膜上，且隨著自噬小體的形成由 LC3-I 轉換為 LC3-II，因此觀察 LC3-II 在細胞中的含量變化即可反映自噬作用的進行 (Kabeya et al., 2000)，另一個指標則是自噬作用受體蛋白 p62 (autophagy receptor p62)，p62 會與泛素化蛋白連接並隨著這些蛋白一起被降解 (Bjorkoy et al., 2005)。

由於細胞自噬作用的重要功能即為清除細胞內的異常蛋白質，因此 β 類澱粉蛋白被推測可能是自噬作用的主要作用目標之一，且有研究證實在阿茲海默氏症患者及實驗老鼠的腦部中發現異常聚集的自噬囊泡(autophagic vacuoles, AVs)，顯示 β 類澱粉蛋白的清除與自噬作用間存在一定程度的聯繫 (Hung et al., 2009; Yu et al., 2005; Yu et al., 2004)。另外，也有部分研究顯示，溶酶體或自噬作用失去功能可能導致阿茲海默氏症及其他神經退化性疾病的發生 (Colacurcio et al., 2018; Ntsapi et al., 2018)。

研究動機及目標



目前阿茲海默氏症患者所用的藥物之主要功效是減緩病程和緩和病情，但尋找可直接用於預防或治療的藥物才是研究的首要目標。根據 β 類澱粉蛋白假說， β 類澱粉蛋白在胞外聚集所引發的後續效應會最終導致阿茲海默氏症。因此，為了降低 β 類澱粉蛋白的產生，我們希望找到可專一調控 γ -secretase 對 amyloidogenic 反應路徑之作用的目標物。在利用 RNA 干擾篩選出 ATP6V0d1 為一可具有選擇性調節 γ -secretase 催化 amyloidogenic 反應路徑之候選標的基因後，本論文即以 ATP6V0d1 蛋白為研究目標，希望能了解 ATP6V0d1 蛋白是以何種分子機制達到選擇性調節 γ -secretase 的效果。由於 ATP6V0d1 蛋白是參與維持溶酶體酸性環境的一重要組成分子，我們假設改變 ATP6V0d1 蛋白表現量時，會影響到細胞自噬作用反應效率，干擾 APP-C99 被細胞自噬作用清除的效率，而影響 β 類澱粉蛋白的生產效率。研究結果將有助於調控 β 類澱粉蛋白的產生及清除之反應機轉，並確認 ATP6V0d1 蛋白是否具有發展為阿茲海默氏症藥物標靶的可能性。

研究材料



細胞株

HEK293	一種較容易進行轉染而可用於表達外源基因的細胞株，且有研究指出其基因表達與神經細胞類似。(Shaw et al., 2002)
HEK293T	HEK293 細胞株衍生的一種細胞株，常用於慢病毒製造。
CCNY	在 HEK293 細胞中轉殖入 CFP-tagged C99 和 YFP-tagged NΔE (extracellular domain truncated Notch)，使兩者可同時在細胞中大量表現。

細胞培養

品名	廠商
DMEM	GIBCO
DMSO	SIGMA
Fetal Bovine Serum	GIBCO
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Solution	Biological industries
Puromycin	CalBioChem
0.5% Trypsin-EDTA(10X)	Life technologies
Zeocin	Invitrogen

抗體

	品名	廠商	宿主	使用比例
初級 抗體	ATP6V0d1	abcam	mouse	WB 1:2500
	GAPDH(0411)	Santa Cruz	mouse	WB 1:10000
	GFP	Santa Cruz	mouse	WB 1:5000
	LAMP1(H4A3)	DSHB	mouse	IF 1:200
	LC3B	NOVUS	rabbit	WB 1:7000 IF 1:200
	SQSTM1	Abnova	mouse	WB 1:3500
	V-ATPase D1(34-Z)	Santa Cruz	mouse	IF 1:200
二級 抗體	Alexa Fluor 488 Anti-rabbit IgG(H+L)	Life technologies	goat	IF 1:1000
	Alexa Fluor 546 Anti-mouse IgG(H+L)	Life technologies	goat	IF 1:1000
	Alexa Fluor 647 Anti-mouse IgG(H+L)	Life technologies	goat	IF 1:1000
	Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	goat	WB 1:10000
	Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	goat	WB 1:10000

核 染	NucBlue Fixed Cell Stain. DAPI special Formulation	Thermo Fisher Scientific		IF 1:1000
	Propidium Iodide	Invitrogen		500 nM

試劑

試劑名稱	廠商
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Geneaid Plasmid Midi Kit	Geneaid
Human Abeta ELISA kit	Thermo Fisher Scientific
Immobilon Western	Millipore
Lysosensor yellow/blue dextran	Thermo Fisher Scientific
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Poly-L-Lysine	SIGMA
Presto Mini Plasmid Kit	Geneaid
Protease Inhibitor Cocktail Set	Calbiochem
Stripping buffer	Thermo Fisher Scientific

藥品

藥品名稱	廠商
Acrylamide/Bis solution 37.5:1	BIO-RAD
Agar Bacteriologico Americano	Pronadisa
Agarose LE	Affymetrix
Ammonium persulfate	SIGMA
BES	SIGMA
Bovine Serum Albumin	SIGMA
Calciumchloride-Dihydrat	Millipore
Chloroform	SIGMA
Ethanol	SIGMA
Glycine	Millipore
HEPES	SIGMA
IGEPAL CA-630 (NP-40)	SIGMA
LB broth	Millipore
Magnesium sulfate	SIGMA
MES hydrate	SIGMA
Methanol	Millipore
Monenscin	SIGMA
Nigericin	SIGMA

藥品名稱	廠商
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	SIGMA
Phenol:chloroform:isoamyl Alcohol. 25:24:1	SIGMA
Sodium acetate	SIGMA
Sodium bicarbonate	SIGMA
Sodium butyrate	SIGMA
Sodium Chloride	Millipore
Sodium hydroxide	Millipore
Sodium orthovanadate	SIGMA
Titriplex III (EDTA)	Millipore
Tris	Millipore
Triton X-100	J.T.Baker
TWEEN-20	SIGMA

溶液

溶液名稱	配方
2X BES buffer	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O, 分裝後調整 pH 值，分別為 6.91, 6.95, 6.97, 7.00, 7.01
Blocking buffer for WB	5%安佳脫脂奶粉 in TBST
Blocking buffer for IF	1%BSA, 22.52 mg/ml glycine in PBST
Culture medium, pH 7.0~7.2 (1 L)	一包 DMEM, 3.7 g NaHCO ₃ , ddH ₂ O
Lysis buffer	150 mM NaCl, 25 mM Tris base, 1%NP-40, 1 mM EDTA 使用前加入 1X protease inhibitor, 1 mM Na ₃ VO ₄
MES buffer	5 mM NaCl, 115 mM KCl, 1.3 mM MgSO ₄ , 25 mM MES, ddH ₂ O 分裝後調整 pH 值，分別為 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5
10X PBS, pH 7.4 (1 L)	80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O, 2 g KH ₂ PO ₄ , ddH ₂ O
PBS-EDTA	5 mM EDTA in PBS
PBST (500 ml)	50 ml 10X PBS, 450 ml ddH ₂ O, 0.5 ml Tween-20
13%(w/v) PEG 8000/1.6 M NaCl	32 ml 5 M NaCl, 13 g PEG 8000
10X Running buffer (1 L)	29 g Tris base, 144 g glycine, 10 g SDS, ddH ₂ O
6X SDS sample buffer (10 ml)	7 ml 4X Tris • Cl/SDS (pH 6.8), 1 g SDS, 3 ml glycerol, 0.93 g DTT, 1.2 g bromphenol blue, ddH ₂ O

溶液名稱	配方
10X TBS, pH 7.6 (1 L)	24.2 g Tris base, 80 g NaCl
1X TBST (1 L)	100 ml 10X TBS, 900 ml ddH ₂ O, 1 ml Tween-20
25X Transfer buffer (1 L)	36.4 g Tris base, 180 g glycine, ddH ₂ O
1X Transfer buffer (1 L)	40 ml 25X Transfer buffer, 760 ml ddH ₂ O, 200 ml methanol
4X Tris • Cl/SDS, pH 6.8 (500 ml)	30.25 g Tris base (0.5 M), 2 g SDS, ddH ₂ O
4X Tris • Cl/SDS, pH 8.8 (500 ml)	91 g Tris base (1.5 M), 2 g SDS, ddH ₂ O

器材及儀器

10 cm dish	1 μ Slide 4 well ibiTreat	細胞培養箱	鑷子
6 well plate	15 mm micro cover glass	生物安全櫃	牙籤
96 well plate	Micro slide glass (S2215)	化學抽風櫃	塑膠離心管
15 ml 離心管	多功能微量盤分析儀	37 °C 烘箱	製膠台
50 ml 離心管	奈米分光光度計	水浴槽	尺梳
T75 flask	冷光螢光影像分析系統	乾浴槽	電泳槽
Sample 盒	Zeiss LSM880	震盪儀	轉漬槽
避光 sample 盒	顯微鏡	高速離心機	酒精燈
八爪 pipet	SRP28SA rotor	超高速離心機	pH meter

研究方法



慢病毒(Lentivirus)製作

慢病毒能感染分裂及不分裂的細胞，且其所攜帶之基因可直接嵌入目標細胞的染色體中表現，而非短暫存在於細胞中 (Segura et al., 2013)。

Short Hairpin RNA 質體放大

shRNA 可與目標 mRNA 之特定片段結合而使該條 mRNA 無法被轉譯，故可達到基因表現干擾的目的。將帶有 shRNA 片段的質體送入 *E.Coli* 中，以 U6 啟動子來確保其表現，大量培養 *E.Coli* 後從中萃取出質體並以 PEG8000 純化質體後測定 DNA 濃度以待後續使用，保存於-20 °C 冰箱。

由於所用於攜帶 shRNA 的質體中包含抗抗生素 puromycin 之片段，因此可使用 puromycin 對被感染之細胞進行篩選，經 puromycin 篩選後可存活即表示有成功將質體送入細胞並嵌入染色體中持續表現。

磷酸鈣轉染

事先將製備好的 2.5 M 氯化鈣與不同酸鹼值的 2X BES buffer (pH 6.90-pH 7.05) 混勻並在室溫下靜置 15 分鐘，選擇可形成較大而邊緣完整的沉澱顆粒之特定酸鹼值之 2X BES buffer 供後續使用 (Okayama and Chen, 1991)。

將提供包裹所須的 Gag 蛋白、反轉錄酶與 Rev 蛋白的 pCMVDR8.91、提供 VSV 套膜蛋白的 pMD.G 和 shRNA 序列的質體以 3:1:4 的比例混勻，總 DNA 量為 10 μ g (Karolewski et al., 2003)，將 DNA 與氯化鈣混合並加入特定酸鹼值之 2X BES buffer，在室溫下靜置 15 分鐘使之形成極細且可溶的共沉澱微粒後，加入細胞培養液中，讓共沉澱微粒黏附到細胞表面並藉由細胞內吞作用被送入 HEK293T 細胞中，最終製造出可抑制 ATP6V0d1 基因表現的慢病毒。



慢病毒收集、濃縮

細胞產生的慢病毒會懸浮細胞培養液中，故連續收集三天細胞培養液並以 2000 rpm，4 °C 離心 10 分鐘去除細胞殘渣，再以 25000 rpm，4 °C 離心 3 小時，保留離心管內的慢病毒沉澱，用 1X PBS 在水平震盪儀上回溶隔夜，分裝於微量離心管並保存於 -80 °C 冰箱，每次使用皆須置於冰上。

慢病毒濃度測定

在微量分析盤每孔種 10^4 顆 HEK293T 細胞，培養 24 小時後將慢病毒液解凍並進行序列稀釋，分別用 1/2 X、1/4 X、1/8 X、1/16 X、1/32 X、1/64 X、1/128 X、1/256 X 的慢病毒液感染細胞，培養 24 小時後用 puromycin (最終濃度為 1.25 $\mu\text{g/ml}$) 對細胞進行篩選，經過 48 小時後觀察細胞存活情況，選定可使細胞之存活情況等同未經 puromycin 之組別的濃度作為後續實驗之使用濃度。

抑制 ATP6V0d1 基因表現

在六孔培養盤中每孔種入 2×10^5 顆細胞，第 2 天以慢病毒進行感染，且由於細胞數增加 20 倍故使用之慢病毒濃度為滴度測定中選定濃度的 20 倍，第 3 天吸除含病毒液之培養液到 10% 漂白水並替換為 3 ml 含最終濃度為 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 之 puromycin 的培養液以對細胞進行篩選，除完全不作任何處理、對照組病毒處理和實驗組病毒處理外，需多加一個 puromycin 對照組以確定 puromycin 可正常作用。Puromycin 篩選 2 天、3 天和 4 天後收集細胞樣本進行蛋白質含量分析及免疫染色。

西方墨點法(Western Blot)

細胞樣本收集

從 37 °C，5%CO₂ 培養箱中將六孔培養盤移至冰上，吸去培養液後每孔加入 500 μl PBS-EDTA，冰上靜置 5 分鐘後利用細胞刮勺將細胞刮下，收集至微量離心管中，以 8000 rpm，4 °C 離心 1 分鐘，去除上清液後重複一次相同步驟，將沉澱的細胞以

lysis buffer 進行裂解，在試管震盪器上震 10 秒後以迷你微量離心機快速離心數秒使溶液不殘留於管壁上，插在冰上 10 分鐘後相同步驟重複兩次，將微量離心管以 13200 rpm，4 °C 離心 30 分鐘，最後將上清液收集到新的微量離心管中並標明日期和編號，保存於-80 °C 冰箱中。

蛋白質濃度測定

以 Thermo Scientific Pierce BCA protein Assay Kit 進行蛋白質濃度測定。將 BCA Assay Kit 的 A 和 B 劑以 50:1 的比例配置 BCA 混合液，用 BSA 配置不同濃度的蛋白質標準液，細胞樣本及標準液分別與 BCA 混合液混勻，60 °C 水浴 30 分鐘，每管取 200 μ l (3 重複) 加入微量分析盤，測定其 562 nm 之吸收光，繪製標準曲線並計算細胞樣本之濃度。


電泳樣品製備

計算好各樣本濃度後，每個樣本取 30 μ g 之蛋白質，以 lysis buffer 補至相同體積後和 6X SDS sample dye 混勻，97 °C 乾浴 5 分鐘，保存於-20 °C 冰箱中。

電泳、轉漬及抗體使用

視目標蛋白質大小決定使用之電泳膠體(SDS-PAGE gel)中 acrylamide 的濃度，鑄好膠後用 running buffer 倒滿電泳槽和樣品槽，將樣品由右向左依序加入樣品槽中，並在兩側加入 protein ladder，利用 SDS 帶負電的原理使蛋白質往正電極移動，以 120 V 跑膠 30 分鐘使樣品通過上層膠，再以 140 V 跑膠 2 小時將蛋白質分離開來。事先用甲醇活化 PVDF 膜，依序在轉漬夾中由負極向正極放入海綿、濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 膜、濾紙、海綿，確定無氣泡存在後夾好，放入轉漬槽中並倒滿 transfer buffer，以固定 80 V 轉漬 75 分鐘。

轉漬完成後，將 PVDF 膜泡在 5% 脫脂牛奶中在室溫下搖晃 1 小時，防止蛋白質以外的位置與抗體發生非專一性結合，之後將 PVDF 膜放入有蓋容器並浸泡於一級



抗體中，視抗體種類而有不同稀釋比例，在 4 °C 冰箱中的水平震盪儀上反應隔夜。隔天將一級抗體倒除後以 TBST 進行清洗兩次，每次 10 分鐘，在將 PVDF 膜浸泡於二級抗體中，稀釋比例為 1:10000，室溫下反應 1 小時後再以 TBST 清洗 10 分鐘，共兩次。以 1:1 混勻 HRP substrate 之 A 和 B 劑後倒在 PVDF 膜上，UVP 系統偵測冷光反應訊號強度。

Lysosome pH 值測定

在黑色微量分析盤每孔種入 10^4 顆 HEK 細胞，並在正式進行 lysosome pH 值測定之相同時間加入等量培養液，最終在第 5 天加入 10 $\mu\text{g/ml}$ Lysosensor 並於培養箱中靜置 1 小時，倒除盤中培養液並分別加入 100 μl pH 值為 3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、7.5 之 MES buffer 與 10 μM Monensin 和 10 μM Nigericin，靜置兩分鐘後以 335 nm 波長進行激發並測量 452 nm 與 521 nm 之發射光強度，計算 E521:E452 比值並繪製 pH 值校正曲線。

在黑色微量分析盤的每孔種入 10^4 顆 HEK 細胞，經慢病毒感染和 puromycin 篩選 2 天後加入 10 $\mu\text{g/ml}$ Lysosensor 並於培養箱中靜置 1 小時，之後倒去盤中培養液並加入 100 μl 4 °C PBS，靜置兩分鐘後以 335 nm 波長進行激發並測量 452 nm 與 521 nm 之發射光強度，計算 E521:E452 比值並以校正曲線公式計算 pH 值。

細胞免疫染色

因細胞經長時間培養會過於密集而不適合直接進行染色拍照，故在進行染色前會將處理過的細胞重新種入放有蓋玻片的新盤中。

先在新的六孔培養盤中放入 15 mm 圓形蓋玻片，加入 poly-L-Lysine 在培養箱中靜置 30 分鐘後用 PBS 清洗並風乾。將經慢病毒感染及 puromycin 篩選 2 天後的細胞以 PBS 清洗，用 trypsin 將細胞從原先的六孔培養盤上切下並計數，再以適當密度種入有蓋玻片的六孔培養盤中。

	Puromycin 篩選 2 天	Puromycin 篩選 3 天	Puromycin 篩選 4 天
細胞數	4 x 10 ⁵ 顆	4 x 10 ⁵ 顆	2 x 10 ⁵ 顆
puromycin	0 µg/ml	1.25 µg/ml	1.25 µg/ml

從培養箱中取出六孔培養盤，吸去培養液後用 PBST 清洗 3 次，加入 1 ml -20 °C 保存的 100% 甲醇處理 5 分鐘以固定細胞，用 4 °C 保存的 PBS 清洗 3 次後加入 1 ml 0.1% Triton X-100/PBS 處理 5 分鐘以打破細胞膜，再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘。後續或直接避光以 500 nM Propidium Iodide (PI) 進行 1 分鐘核染及 PBS 清洗後封片，或加入 1 ml blocking buffer 處理 30 分鐘後進行免疫染色。

在潮濕環境下進行一級抗體染色，並將整個容器置於 4 °C 冰箱中隔夜，隔天以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘。隨後進行二級抗體染色，避光於室溫處理 1 小時後以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘。最後在載玻片上滴上 12 µl 封片膠並將玻片蓋上，隔天以指甲油固定邊緣。最後以共軛焦顯微鏡 63X 油鏡觀察並拍照。

胞內外 A β ₄₀ 濃度測定

依前述方式抑制 ATP6V0d1 基因表現，並在收集細胞內蛋白質樣本前一天將細胞培養液更換為含有 5 mM HEPES 的培養液，隔天收集 500µl 細胞培養液並加入 5 µl protease inhibitor，混勻後離心 2000 rpm，5 分鐘，將上清液保存於 -80 °C 冰箱。收集細胞蛋白質樣本並測定蛋白質濃度以進行校正。

依照 Human A β ₄₀ ELISA Kit 說明書的指示將所需溶液取出回溫後，製備 1X wash buffer、1:1 Medium-dilution Buffer 及各濃度的 A β ₄₀ 標準液。以 1:1 Medium-dilution Buffer 將收集到的培養液樣本稀釋 16 倍後即可準備進行實驗。

取 50 µl 各濃度標準液及待測樣本加入測量盤後，加入 50 µl A β reaction antibody，貼上透明封膜並於 4 °C 冰箱內反應過夜。隔天，先將所需溶液取出回溫，再用 1X Wash Buffer 清洗 4 次，確實甩乾盤內液體後加入 100 µl anti-rabbit HRP antibody，室溫下反應 30 分鐘，用 1X Wash Buffer 清洗 4 次並確實甩乾，在避光情形下加入

100 μ l stabilized chromogen (包含 blank)於室溫反應 10-20 分鐘(藍色)，加入 100 μ l stop solution 終止反應(黃色)後，測定 OD₄₅₀ 數值，繪製標準曲線後計算樣本濃度。



影像處理與數據統計


蛋白質量化

用 Image J 分別針對蛋白質條帶進行定量，並以 GAPDH 訊號進行均量化，量化後的數據統計顯著性則以 t test 進行計算。

螢光訊號量化

利用 Image J 的任意選取工具在可見光影像中選取單一細胞範圍後，將之記錄在 ROI 工具列表中，確保每顆細胞的圈選範圍在不同螢光影像中皆一致，再於個別螢光影像中分別針對單顆細胞進行螢光訊號之量化，比較抑制 ATP6V0d1 基因後是否造成螢光訊號亮度之改變，數據統計顯著性則以 t test 進行計算。

實驗結果



如同在前面所提到的， γ -secretase 除了 C99 之外還有許多其他受質，其中尤以 Notch 蛋白對細胞整體生理功能最為重要，因此我們實驗室針對 Notch 路徑和 amyloidogenic 反應路徑進行篩選實驗並挑出一種與阿茲海默氏症的相關性目前尚未被深入研究之潛在 γ -secretase 調控蛋白—ATP6V0d1 蛋白，且 ATP6V0d1 蛋白對 γ -secretase 的影響主要表現在對 amyloidogenic 反應路徑的調控上。之前的篩選實驗是在帶有 GAL4-driven Luciferase 報導基因的 HEK 細胞中分別表現人類 C99-GAL4 與老鼠 NΔE-GAL4，以分別建立 CG 細胞株和 NG 細胞株，並在這兩種細胞株中進行 Luciferase 冷光強度觀察與分析。為了進一步驗證由 ATP6V0d1 基因所製造的 ATP6V0d1 蛋白確實在 γ -secretase 作用於 amyloidogenic 反應路徑中扮演重要調控角色，且對 Notch 路徑影響較輕微，我使用實驗室所建立的 CCNY 細胞株進行後續實驗，CCNY 細胞株是在 HEK 細胞中轉殖入 CFP-tagged C99 和 YFP-tagged NΔE，使 NΔE 和 C99 帶有不同顏色的螢光且可同時在細胞中大量表現，利於同時觀察並比較進行特定實驗處理對於 Notch 路徑和 amyloidogenic 反應路徑的影響和造成的改變。

由於我的實驗處理是利用帶有特定 shRNA 的慢病毒對細胞進行感染，故須利用同樣經慢病毒感染的細胞作為對照組，以避免因慢病毒感染之壓力造成的性狀改變被誤判。在實驗中選用帶有 lacZ 基因之 shRNA 序列的慢病毒來作為對照組 (MOCK)，由於人類細胞中並不包含 lacZ 基因，因此以這種對照組慢病毒感染人類細胞後不會因影響正常人類基因表現而造成生理功能之改變。

兩株獨立 shRNA 慢病毒的使用

由於 short hairpin RNA 的序列很短，因此有可能會錯誤辨認並接上非目標基因之 mRNA，抑制其他基因表現而並未成功抑制目標基因，為了確定慢病毒感染後表現的生理改變確實是因干擾 ATP6V0d1 基因表現而造成，使用兩株由獨立的 shRNA 製作成的慢病毒對細胞進行感染，分別為 SH440 和 SH502 慢病毒株。



延長實驗處理時間可增強抑制 ATP6V0d1 基因表現之後續效應

參考 Lee et al. 在 2015 年針對 V-ATPase 次單元 V0a1 之研究中的發現，將實驗處理時間延長可有效提升干擾次單元 V0a1 產生所造成的 LC3-II 含量變化 (Lee et al., 2015)，推測 ATP6V0d1 蛋白可能有相似情形而可隨時間延長而強化抑制 ATP6V0d1 基因表現所造成的後續影響，故將實驗處理時間定為 Puromycin 篩選 2 天、3 天和 4 天後收集細胞樣本。

shRNA 可有效干擾 ATP6V0d1 基因之表現

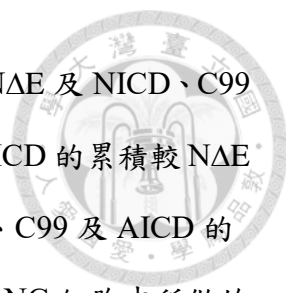
為了藉由抑制 ATP6V0d1 基因表現來減少 ATP6V0d1 蛋白在細胞中的含量以研究其功能，利用慢病毒系統製造出帶有針對 ATP6V0d1 之 shRNA 序列的慢病毒，並用以感染 HEK 細胞和 CCNY 細胞，使細胞內的 ATP6V0d1 基因無法正常轉譯而產生較少的 ATP6V0d1 蛋白，在經過兩天的 puromycin 篩選保留成功感染慢病毒而可抵抗 puromycin 的細胞後，收集細胞裂解液並以西方墨點法進行蛋白質含量分析。在 HEK293 細胞株中，經過慢病毒感染並以 puromycin 篩選兩天後，SH440 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 ATP6V0d1 蛋白之蛋白質表現量顯著下降為對照組的 $34.6 \pm 9.6\%$ ，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 ATP6V0d1 之蛋白質表現量顯著下降為對照組的 $34.0 \pm 10.5\%$ (圖一，A)。而在 CCNY 細胞株中，經過慢病毒感染並以 puromycin 篩選 2 天、3 天及 4 天後，SH440 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 ATP6V0d1 之蛋白質表現量分別下降為對照組的 $32.9 \pm 12.4\%$ 、 $33.8 \pm 6.2\%$ 、 $36.3 \pm 3.9\%$ (圖一，B)，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 ATP6V0d1 之蛋白質表現量則分別下降為對照組的 $19.8 \pm 13.4\%$ 、 $16.8 \pm 9.0\%$ 、 $29.0 \pm 6.2\%$ (圖一，B)。另外，在細胞免疫染色中也呈現顯著的抑制效果(圖一，C)。由上述實驗結果可確定，所使用的兩種慢病毒株可有效干擾 ATP6V0d1 基因之表現，並降低 ATP6V0d1 蛋白在細胞中的含量。

干擾 ATP6V0d1 基因表現對 amyloidogenic 反應路徑的影響較顯著

為了研究 ATP6V0d1 蛋白是否有調控 γ -secretase 的功能，在確認感染 SH440 和 SH502 慢病毒株皆可顯著使細胞內 ATP6V0d1 蛋白質含量降低後，進一步利用西方墨點法分析干擾 ATP6V0d1 表現後造成的後續影響，Anti-GFP 抗體可用於偵測其變異體 YFP 及 CFP 訊號，故利用 Anti-GFP 作為初級抗體偵測蛋白質含量並以分子量大小來分辨不同的目標蛋白質，觀察 YFP-tagged N Δ E 及其 γ -secretase 切割產物 NICD、CFP-tagged C99 及其 γ -secretase 切割產物 AICD 在細胞中的含量變化。

在 CCNY 細胞株中，以 SH440 感染並經 puromycin 篩選 2 天、3 天及 4 天後，細胞內 N Δ E 的蛋白質含量改變為對照組的 86.1 \pm 13.2%、101.5 \pm 13.4%、152.5 \pm 33.7%，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 N Δ E 的蛋白質含量上升為對照組的 142.0 \pm 21.5%、143.1 \pm 37.1%、193.3 \pm 22.2%。而細胞內 NICD 的蛋白質含量在 SH440 感染並經 puromycin 篩選 2 天、3 天及 4 天後變為對照組的 94.3 \pm 10.9%、86.9 \pm 18.1%、113.0 \pm 38.7%，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 NICD 蛋白質含量上升為對照組的 140.0 \pm 49.5%、132.1 \pm 34.1%、140.1 \pm 43.1%。整體上來看，抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 N Δ E 及其 γ -secretase 切割產物 NICD 的含量在細胞內呈現上升現象(圖二，A、B)。

而在 CCNY 細胞株中，以 SH440 感染並經 puromycin 篩選 2 天、3 天及 4 天後，細胞內 C99 的蛋白質含量改變為對照組的 88.9 \pm 23.0%、121.5 \pm 55.5%、193.8 \pm 84.2%，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 C99 的蛋白質含量上升為對照組的 184.0 \pm 81.6%、390.5 \pm 142.4%、436.9 \pm 146.3%。而細胞內 AICD 的蛋白質含量在 SH440 感染並經 puromycin 篩選 2 天、3 天及 4 天後變為對照組的 84.1 \pm 28.2%、95.6 \pm 28.9%、142.2 \pm 43.2%，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 AICD 蛋白質含量上升為對照組的 152.3 \pm 30.7%、280.2 \pm 207.0%、363.3 \pm 160.1%。顯示抑制 ATP6V0d1 基因表現造成 C99 及其 γ -secretase 切割產物 AICD 的含量在細胞內明顯有上升現象(圖二，A、C)。



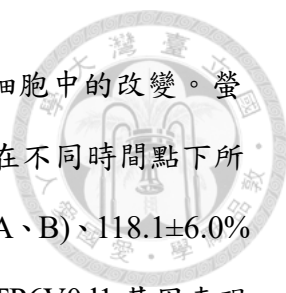
綜合以上結果可發現抑制 ATP6V0d1 基因表現後，細胞內 NΔE 及 NICD、C99 及 AICD 的含量相較於對照組中的含量皆稍有增加，且 C99 及 AICD 的累積較 NΔE 及 NICD 明顯。隨著實驗處理時間延長，細胞內 NΔE 及 NICD、C99 及 AICD 的含量皆出現增加的趨勢。蛋白質量的變化結果應證之前在 CG 和 NG 細胞中所做的 Luciferase assay 結果，顯示 ATP6V0d1 蛋白可能對於 amyloidogenic 反應路徑的影響較顯著。

干擾 ATP6V0d1 基因表現會使 γ -secretase 活性下降

若以 γ -secretase 產物對受質含量比例計算 γ -secretase 活性，則可發現相較於對照組，抑制 ATP6V0d1 基因表現後， γ -secretase 的活性隨著處理時間延長似乎有略微下降的趨勢(圖二，D)，在 SH440 處理後並以 puromycin 進行不同時間長度之篩選後， γ -secretase 切割 NΔE 之相對活性分別為對照組之 $111.8\pm 22.1\%$ 、 $87.5\pm 12.8\%$ 、 $72.6\pm 9.6\%$ ，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現後， γ -secretase 切割 NΔE 之相對活性分別為對照組的 $99.5\pm 36.1\%$ 、 $92.7\pm 8.5\%$ 、 $72.3\pm 18.2\%$ 。而在 SH440 感染細胞並經 puromycin 篩選 2 到 4 天後， γ -secretase 切割 C99 之相對活性分別為對照組之 $93.4\pm 16.5\%$ 、 $83.1\pm 21.5\%$ 、 $82.0\pm 15.3\%$ ，SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現後， γ -secretase 切割 C99 之相對活性分別為對照組的 $93.3\pm 30.7\%$ 、 $70.0\pm 26.0\%$ 、 $83.7\pm 22.7\%$ 。顯示 γ -secretase 活性會稍微受到 ATP6V0d1 基因表現的影響，故推測 ATP6V0d1 蛋白可能有調控 γ -secretase 活性的功能(圖二，D)。但 γ -secretase 活性下降的現象似乎並未專一針對 amyloidogenic 反應路徑，且影響幅度似乎也並不足以解釋大量增加的受質及 γ -secretase 切割產物之變化量，因此推測 ATP6V0d1 蛋白可能還會藉由別的方式影響細胞內 NΔE 及 NICD、C99 及 AICD 的含量。

干擾 ATP6V0d1 基因表現可能會影響蛋白質降解途徑

為了解 ATP6V0d1 會藉由何種途徑影響細胞內 NΔE 及 NICD、C99 及 AICD 的含量，利用細胞免疫染色藉螢光強度觀察 YFP-tagged NΔE 及其 γ -secretase 切割




產物 NICD、CFP-tagged C99 及其 γ -secretase 切割產物 AICD 在細胞中的改變。螢光結果顯示在以 SH440 慢病毒株抑制 ATP6V0d1 基因表現後，在不同時間點下所測得之 YFP 螢光訊號分別增強為對照組的 $130.4\pm 10.7\%$ (圖三, A、B)、 $118.1\pm 6.0\%$ (圖三, C、D)、 $203.6\pm 22.4\%$ (圖三, E、F)，而在 SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，YFP 螢光訊號分別增強為對照組的 $130.5\pm 18.4\%$ (圖三, A、B)、 $127.6\pm 5.8\%$ (圖三, C、D)、 $159.8\pm 7.5\%$ (圖三, E、F)。在 CFP 訊號方面，以 SH440 慢病毒株抑制 ATP6V0d1 基因表現後，在不同時間點下所測得之 CFP 螢光訊號分別增強為對照組的 $156.7\pm 18.8\%$ (圖三, A、B)、 $123.0\pm 7.0\%$ (圖三, C、D)、 $205.4\pm 22.6\%$ (圖三, E、F)，而在 SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，CFP 螢光訊號分別增強為對照組的 $151.5\pm 9.0\%$ (圖三, A、B)、 $138.9\pm 13.0\%$ (圖三, C、D)、 $254.6\pm 43.4\%$ (圖三, E、F)。

整體而言，YFP 和 CFP 螢光訊號皆有明顯增強，且隨著處理時間延長而略有小幅度的增加，與西方墨點法之結果大致相同，且 YFP 和 CFP 皆出現明顯聚集，這個現象可能與過量產生之 YFP-tagged N Δ E、CFP-tagged C99 及兩者之 γ -secretase 切割產物 NICD 和 AICD 無法被有效清除有關，因此推測這些蛋白質的過量累積聚集可能是藉由影響蛋白質降解途徑而造成。

干擾 ATP6V0d1 基因表現會影響細胞自噬作用

有許多研究指出，細胞自噬作用的異常可能在阿茲海默氏症中扮演特定角色，且其功能即在於協助降解異常蛋白質 (Ntsapi et al., 2018)。為了研究細胞自噬作用是否受到 ATP6V0d1 基因表現的影響，我們利用西方墨點法進行細胞內的蛋白質含量變化分析，發現在干擾 ATP6V0d1 基因表現後，自噬作用指標蛋白 LC3 和 p62 相較於對照組確實出現明顯變化。以 SH440 抑制 ATP6V0d1 後，LC3-I 的含量基本上與對照組相同，而 LC3-II 的含量則隨實驗時間的延長有上升的趨勢，分別為對照組的 $97.7\pm 23.0\%$ 、 $161.7\pm 23.0\%$ 、 $177.0\pm 31.9\%$ ，LC3-II/LC3-I 的比值則分別為對照組的 $116.3\pm 24.6\%$ 、 $144.9\pm 17.1\%$ 、 $130.8\pm 9.5\%$ 。SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表



現的結果大致與 SH440 相似，LC3-II 的含量分別上升為對照組的 $157.4\pm 41.9\%$ 、 $262.5\pm 24.3\%$ 、 $249.2\pm 126.2\%$ ，LC3-II/LC3-I 的比值則分別為對照組的 $198.1\pm 26.6\%$ 、 $261.2\pm 73.5\%$ 、 $196.9\pm 71.3\%$ 。顯示在實驗組中有較多自噬小體或自噬溶小體的存在，且隨處理時間延長有上升趨勢(圖四，A、B)。但同時 p62 的含量也出現上升趨勢，SH440 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，不同時間點觀察到的 p62 分別為對照組的 $84.3\pm 10.1\%$ 、 $108.1\pm 24.3\%$ 、 $144.6\pm 38.0\%$ ，而以 SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，不同時間點觀察到的 p62 含量分別為對照組的 $115.7\pm 25.4\%$ 、 $152.7\pm 37.2\%$ 、 $304.7\pm 167.7\%$ 。顯示有較多應被自噬溶小體內的水解酵素降解之 p62 仍未被降解，也就代表自噬溶小體的降解出現異常情況，且累積的 p62 含量明顯隨實驗處理時間延長而增多(圖四，A、C)。綜合上述兩個實驗結果，可知細胞自噬作用的過程受到阻礙。

另一方面，為了確認 LC3-II、p62 的蛋白質量及 LC3-II/LC3-I 比值的上升現象確實是因抑制 ATP6V0d1 表現而造成的，在 HEK293 細胞株中進行了相同的實驗。以 SH440 感染細胞後，LC3-I 含量不變，LC3-II 含量為對照組的 $134.0\pm 8.0\%$ ，LC3-II/LC3-I 比值為對照組的 $143.0\pm 7.7\%$ ，而 p62 則是對照組的 $140.8\pm 25.9\%$ ；以 SH502 處理後，LC3-I 含量同樣不變，LC3-II 含量為對照組的 $157.8\pm 22.5\%$ ，LC3-II/LC3-I 比值為對照組的 $156.3\pm 19.0\%$ ，而 p62 則是對照組的 $207.3\pm 55.4\%$ (圖五，A、B、C)。證實在兩種細胞株中進行 ATP6V0d1 基因表現抑制皆會造成細胞自噬作用被阻礙(圖四、圖五)，顯示缺乏 ATP6V0d1 蛋白對於細胞自噬作用有十分顯著的影響。

干擾 ATP6V0d1 基因表現並不影響自噬小體與溶酶體融合形成自噬溶小體的過程

由這兩個指標蛋白的含量變化可做出兩種推測，一種是抑制 ATP6V0d1 基因表現會使自噬作用的過程中發生異常而造成自噬作用無法正常進行而導致 p62 之降解被阻斷。ATP6V0d1 是 V-ATPase 的組成單元之一，因此我們一開始推測若 ATP6V0d1 蛋白在細胞內含量過少可能會連帶影響到 V-ATPase 的酸化作用而使其

作用之胞器如溶酶體發生異常，進而使自噬小體無法正常與溶酶體融合而造成蛋白質降解被阻斷。另一種可能性則是抑制 ATP6V0d1 基因表現會阻斷自噬作用的最後步驟—自噬溶小體的降解，使細胞內壓力逐漸累積，進而反向促使自噬作用相關基因被開啟而促進自噬作用的進行，但最後仍無法完成自噬溶小體降解，形成一惡性循環。

Mauvezin et al. 在 2014 年以果蠅做的研究顯示自噬小體和溶酶體的融合與 V-ATPase 的酸化作用並無關聯性，他們在果蠅細胞中表現 LAMP1-GFP/mch-Atg8a，並針對果蠅脂肪細胞內的 V0d 產生進行 RNA 干擾後，藉由觀察螢光變化得知自噬小體和溶酶體的融合仍出現明顯 colocalization 現象 (Mauvezin et al., 2015)。因此我們假設抑制 ATP6V0d1 基因表現不會干擾自噬小體和溶酶體的融合，為了驗證這個假說我利用 Anti-LAMP1 進行細胞免疫染色並觀察 LAMP1 在細胞中的含量與分布，LAMP1 是溶酶體的膜上糖蛋白，常作為溶酶體的指標蛋白以呈現溶酶體的位置和數量。螢光結果顯示在以 SH440 慢病毒株抑制 ATP6V0d1 基因表現後，在不同時間點下所測得之 LAMP1 螢光訊號分別增強為對照組的 $168.2 \pm 38.9\%$ (圖三，A、B)、 $126.7 \pm 4.6\%$ (圖三，C、D)、 $218.1 \pm 30.4\%$ (圖三，E、F)，而在 SH502 抑制 ATP6V0d1 基因表現後，LAMP1 螢光訊號分別增強為對照組的 $163.4 \pm 14.1\%$ (圖三，A、B)、 $208.4 \pm 4.2\%$ (圖三，C、D)、 $238.8 \pm 36.5\%$ (圖三，E、F)。顯示在抑制 ATP6V0d1 基因表現後，LAMP1 螢光訊號明顯增強且與 YFP 和 CFP 訊號位置重疊，有 colocalization 現象(圖三)。表示 NΔE 及 NICD、C99 及 AICD 這些蛋白質可能因蛋白質降解途徑異常而累積在自噬溶小體中等待被降解，也可間接證實自噬小體與溶酶體可正常融合形成自噬溶小體。

另外，我們直接以 Anti-LC3 和 Anti-LAMP1 抗體對 HEK293 細胞進行雙重染色，發現在 ATP6V0d1 被抑制後，LC3 和 LAMP1 在細胞中的螢光強度皆明顯上升，且有較多的 colocalization 現象，直接證實自噬小體與溶酶體融合形成自噬溶小體的步驟不受 ATP6V0d1 影響(圖六)。




干擾 ATP6V0d1 基因表現可能連帶影響溶酶體的酸化

有研究顯示 ATP6V0d1 會參與 V-ATPase 活性運作(Nishi et al., 2003)，且 V-ATPase 的重要功能之一即為協助溶酶體酸化，使溶酶體內部保持在適合水解酵素作用的酸鹼值。另外，Mangieir et al.在 2014 年發現 V-ATPase 的另一個次單元 V0c1 會參與 V-ATPase 在溶酶體上進行的酸化作用並進而影響細胞自噬作用的進程 (Mangieri et al., 2014)，因此，我們假設抑制 ATP6V0d1 基因表現阻斷自噬作用的可能途徑即為破壞溶酶體的酸化，使溶酶體內酸鹼值過高，內部水解酵素失活而無法進行降解，最終影響細胞自噬作用。為了驗證 ATP6V0d1 蛋白減少會影響 V-ATPase 功能而破壞溶酶體的酸化，使溶酶體內酸鹼值過高，使用對酸鹼值敏感之染劑 Lysosensor Yellow/Blue Dextran 來偵測細胞內溶酶體的酸鹼值。首先以不同酸鹼值的 MES buffer 處理細胞並進行校正曲線的製作 (Bourdenx et al., 2016; Diwu et al., 1999; Lee et al., 2010) (圖七)，再將對照組及經 SH440 及 SH502 處理的細胞所測得之 I_{521}/I_{452} 螢光比值帶入校正曲線中，算出細胞內溶酶體的酸鹼值。實驗結果發現，對照組中溶酶體酸鹼值約為 pH 4.90，經 SH440 處理後為 pH 5.20，經 SH502 處理後則為 pH 6.68，顯示細胞內溶酶體的酸鹼值有上升的現象(圖七)。

抑制 ATP6V0d1 基因造成 C99 及 AICD 累積但胞外 A β 濃度下降

由於 CCNY 細胞株會產生過量帶有 CFP 的 C99 蛋白，而在 amyloidogenic 途徑中 C99 蛋白會被 γ -secretase 切割為 AICD 和 A β 兩個部分，並將 A β 釋放至胞外，因此可以 CCNY 細胞株模擬阿茲海默氏症病人之神經細胞過量產生 A β 的情況。在我的實驗中發現抑制 ATP6V0d1 基因後出現顯著的 C99 和 AICD 訊號累積，代表蛋白質清除途徑異常，使這些蛋白持續存在細胞內。在這種情況下，我們假設這些過量累積的 C99 蛋白可能持續與新產生的 C99 蛋白一起被 γ -secretase 切割而產生更多的 A β 。為了驗證我的假說，收集經對照組慢病毒、SH440 及 SH502 處理的培養液並利用 Human A β_{40} ELISA Kit 來測定胞外 A β 濃度是否出現與 AICD 一致的增加趨勢。出乎意料的是，分別經慢病毒 SH440 和 SH502 感染及 puromycin 篩選



3 天後，培養液中的 $A\beta_{40}$ 濃度相較於對照組出現明顯的下降趨勢(圖八)。推測這個現象有可能是因為細胞內部的 $A\beta$ 並未被釋放到胞外，因此針對培養液進行 $A\beta_{40}$ 的測定無法得到與 AICD 一致的上升結果，後續可能需要再進行胞內 $A\beta_{40}$ 之測定才能做進一步的推斷。

討論



使用兩種不同細胞株進行實驗的原因

因為我所使用的 CCNY 細胞本身帶有的 YFP 和 CFP，故在進行螢光染色時可另加入的螢光種類較受限制，且市面上提供的 lysosensor 之激發和發射波長皆落在黃光到藍光的範圍間，若在 CCNY 細胞株中加入 lysosensor 則所得的螢光讀值必然被細胞內自發的 YFP 和 CFP 訊號干擾，因此改用 HEK 細胞進行部分免疫染色及細胞內溶酶體酸鹼值的測試。

在西方墨點法和細胞免疫染色結果皆證實 HEK 細胞中的 ATP6V0d1 基因表現可被抑制，並與 CCNY 細胞同樣會發生後續的細胞自噬作用異常，顯示 ATP6V0d1 基因抑制造成的細胞自噬作用異常並非僅在單一細胞株內發生的單一現象。

抑制 ATP6V0d1 基因造成 C99 及 AICD 累積但胞外 A β 濃度下降

在查詢造成胞外 A β_{40} 濃度顯著下降的原因時發現，Nilsson et al. 在 2013 年發表的研究指出，過去已有許多研究將細胞自噬的降解作用與 A β 的代謝連結起來，而他們進一步發現了真正使胞外 A β 濃度下降的原因，即是細胞自噬作用無法正常進行時可能會藉由干擾胞吐作用或其他細胞排泄機制而影響胞內物質運輸及 A β 釋放 (Nilsson et al., 2013)。由於在我的實驗中發現，抑制 ATP6V0d1 基因表現會造成細胞自噬的缺陷，使之無法正常作用，因此很有可能如同 Nilsson 等人所言，A β 釋出細胞外的途徑受到了影響。

為了進一步確定 A β 釋出細胞外的途徑是否確實受到影響，我將後續收集細胞裂解液並同樣使用 Human A β_{40} ELISA Kit 來測量胞內 A β (intracellular A β) 含量是否有上升現象，若胞內 A β_{40} 含量相較對照組確實有上升趨勢，代表 A β 釋出細胞外的途徑確實受到影響。抑制 ATP6V0d1 基因或許會藉由干擾 V-ATPase 來影響 endosome、lysosome 等胞器的功能及其在細胞內的運輸，或干擾細胞的胞吐作用 (Maxson and Grinstein, 2014)，因此 A β 釋出細胞外的途徑被破壞是因細胞自噬的缺陷或是細胞自噬的缺陷加上抑制 ATP6V0d1 基因表現的共同效果則仍屬未知。

另外，由於尚未進行胞內 A β ₄₀的測定，故也無法排除其實胞內 A β ₄₀並未顯著增加或有下降趨勢的可能性，若出現這個情況，可能代表在抑制 ATP6V0d1 基因表現後，反而對A β ₄₀之清除有預料之外的促進現象。




溶酶體內酸鹼值的變化對細胞正常生理功能可能存在潛在影響

正常情況下，溶酶體內部酵素平均的最適當作用環境約為 pH 4.5-pH 5.5 的酸性環境，但我初期實驗所測得的溶酶體基準酸鹼度有偏高的現象，且不單只是經對照組慢病毒處理的細胞之酸鹼度偏高，在未經任何處理的 HEK293 細胞中進行酸鹼值偵測時，所得的酸鹼值也落在 pH 6.5 左右且誤差值也很高。因此參考 Chen et al.的實驗方法針對我原先的實驗方法進行修改，將原先以 pH 6.5 MES buffer 處理的樣本改以 PBS 進行處理，以得到落在正常酸鹼值範圍內的結果 (Chen et al., 2002)，並可確知抑制 ATP6V0d1 確實造成細胞內部之溶酶體酸鹼值上升。

在我的實驗中利用慢病毒抑制 ATP6V0d1 基因表現，使 ATP6V0d1 蛋白在細胞中含量顯著下降，造成 V-ATPase 之架構無法正常建構，引發細胞內部溶酶體酸鹼值上升，另外也不排除其他需要 V-ATPase 協助建立內部酸性環境之胞器同樣受到影響之可能性。且在抑制 ATP6V0d1 基因表現後，細胞表現出顯著蛋白質累積現象，推測是因為溶酶體未正常酸化而使其內部酵素處在無法發揮功能的酸鹼值環境中，故無法將自噬溶酶體內的物質分解，造成細胞自噬作用不能順利進行。

目前對於抑制 ATP6V0d1 表現造成之酸鹼值上升是否會影響從其他面向對細胞自噬作用及其他細胞生理功能造成影響仍屬未知，因此後續可能可以藉由 qPCR 來確知抑制 ATP6V0d1 後，細胞內生性的自噬蛋白受體(p62)之 mRNA 表現量是否有上升現象，即 p62 本身之表現量是否會直接因為抑制 ATP6V0d1 表現造成之酸鹼值上升或 ATP6V0d1 蛋白之缺乏而被調控增加。另外也可利用溶酶體抑制劑 Bafilomycin A1 或 Chloroquine 直接藉由抑制溶酶體酸化及抑制溶酶體與自噬小體融合來破壞細胞自噬作用的進行，用以觀察加入這些抑制劑是否會更強化慢病毒作用後造成的蛋白質累積現象，藉此推斷慢病毒感染後觀察到的蛋白質累積現象



是否確實經由破壞細胞自噬作用造成。同時，還可利用蛋白酶體抑制劑 MG-132 來破壞蛋白酶體之作用，觀察未加入蛋白酶體抑制劑及有加入的情況下，細胞受慢病毒處理後發現的蛋白質累積現象是否有改變，以得知抑制 ATP6V0d1 基因表現是否單純破壞細胞自噬作用或還會同時干擾蛋白酶體降解途徑。藉由以上這些實驗皆可讓我們更進一步了解抑制 ATP6V0d1 對於細胞正常生理功能會造成哪些影響及如何造成這些影響，而這也是往後可以繼續努力的方向。

結論

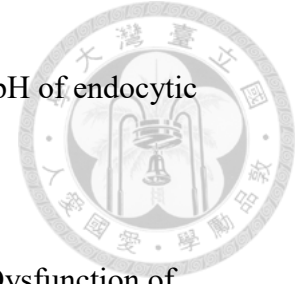
抑制 ATP6V0d1 基因表現會稍微影響 γ -secretase 本身的活性，並伴隨細胞自噬作用的進行被阻斷而造成類澱粉前驅蛋白 C 端片段大量累積於胞內，對細胞造成嚴重壓力，且有前人研究顯示破壞細胞自噬作用會造成 A β 的釋出途徑異常，且無法排除抑制 ATP6V0d1 基因表現共同干擾的可能性。顯示 ATP6V0d1 蛋白的存在對於細胞正常生理功能十分重要，且若此蛋白發生異常可能有潛在強化 amyloidogenic 反應路徑的風險。因此雖然 ATP6V0d1 蛋白或 ATP6V0d1 基因並未如初步預期的可對 γ -secretase 有顯著的區別調控功能，但對於阿茲海默氏症治療的相關研究仍有潛在的可能性。



參考文獻



- Alzheimer's, A. (2017). 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 13, 325-373.
- Bauerle, C., Ho, M.N., Lindorfer, M.A., and Stevens, T.H. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H(+)-ATPase membrane sector. *J Biol Chem* 268, 12749-12757.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171, 603-614.
- Bourdenx, M., Daniel, J., Genin, E., Soria, F.N., Blanchard-Desce, M., Bezdard, E., and Dehay, B. (2016). Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* 12, 472-483.
- Capell, A., Grünberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D.J., and Haass, C. (1998). The Proteolytic Fragments of the Alzheimer's Disease-associated Presenilin-1 Form Heterodimers and Occur as a 100–150-kDa Molecular Mass Complex. *J Biol Chem* 273, 3205–3211.
- Chen, Q.R., Zhang, L., Luther, P.W., and Mixson, A.J. (2002). Optimal transfection with



the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles. *Nucleic Acids Res* 30, 1338-1345.

Colacurcio, D.J., Pensalfini, A., Jiang, Y., and Nixon, R.A. (2018). Dysfunction of autophagy and endosomal-lysosomal pathways: Roles in pathogenesis of Down syndrome and Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med* 114, 40-51.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.

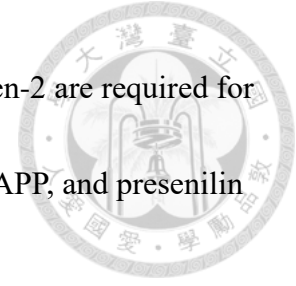
Diwu, Z., Chen, C.S., Zhang, C., Klaubert, D.H., and Haugland, R.P. (1999). A novel aciclotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells *Chemistry & Biology* 6, 411-418.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.

Ferencz, C.M., Petrovszki, P., Der, A., Sebok-Nagy, K., Kota, Z., and Pali, T. (2017). Oscillating Electric Field Measures the Rotation Rate in a Native Rotary Enzyme. *Sci Rep* 7, 45309.

Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 917-929.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M.,



Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Developmental Cell* 3, 85-97.

Gertsik, N., Chau, D.M., and Li, Y.M. (2015). gamma-Secretase Inhibitors and Modulators Induce Distinct Conformational Changes in the Active Sites of gamma-Secretase and Signal Peptide Peptidase. *ACS Chem Biol* 10, 1925-1931.

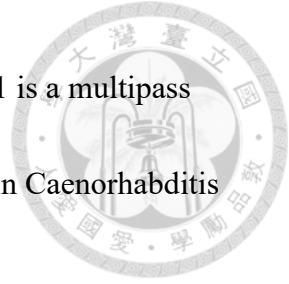
Gertsik, N., Chiu, D., and Li, Y.M. (2014). Complex regulation of gamma-secretase: from obligatory to modulatory subunits. *Front Aging Neurosci* 6, 342.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3-12.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.

Gosztyla, M.L., Brothers, H.M., and Robinson, S.R. (2018). Alzheimer's Amyloid-beta is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *J Alzheimers Dis* 62, 1495-1506.



Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., and Priess, J.R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 775-779.

Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25, 3-28.

Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.

Hippius, H., and Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 5, 101-108.

Hung, S.Y., Huang, W.P., Liou, H.C., and Fu, W.M. (2009). Autophagy protects neuron from A β -induced cytotoxicity. *Autophagy* 5, 502-510.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728.

Kaether, C., and Haass, C. (2004). A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation. *J Cell Biol* 167, 809-812.

Kametani, F., and Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and



- Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 12, 25.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Karolewski, B.A., Watson, D.J., Parente, M.K., and Wolfe, J.H. (2003). Comparison of transfection conditions for a lentivirus vector produced in large volumes. *Hum Gene Ther* 14, 1287-1296.
- Kim, L.D., and Factora, R.M. (2018). Alzheimer dementia: Starting, stopping drug therapy. *Cleve Clin J Med* 85, 209-214.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- Kumar, D.K., Choi, S.H., Washicosky, K.J., Eimer, W.A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L.E., Tanzi, R.E., *et al.* (2016). Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 8, 340ra372.
- LaVoie, M.J., Fraering, P.C., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Kimberly, W.T., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (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.

Lee, J.H., McBrayer, M.K., Wolfe, D.M., Haslett, L.J., Kumar, A., Sato, Y., Lie, P.P.,

Mohan, P., Coffey, E.E., Kompella, U., *et al.* (2015). Presenilin 1 Maintains

Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated

Lysosome Acidification. *Cell Rep* 12, 1430-1444.

Lee, J.H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M.,

Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., *et al.* (2010). Lysosomal

proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by

Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141, 1146-1158.

Mangieri, L.R., Mader, B.J., Thomas, C.E., Taylor, C.A., Luker, A.M., Tse, T.E.,

Huisinigh, C., and Shacka, J.J. (2014). ATP6V0C knockdown in neuroblastoma

cells alters autophagy-lysosome pathway function and metabolism of proteins

that accumulate in neurodegenerative disease. *PLoS One* 9, e93257.

Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and

Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and

Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245-4249.

Mauvezin, C., Nagy, P., Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2015). Autophagosome-lysosome

fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun* 6,

7007.



- Maxson, M.E., and Grinstein, S. (2014). The vacuolar-type H(+)-ATPase at a glance - more than a proton pump. *J Cell Sci* 127, 4987-4993.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873.
- Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S., Tanaka, M., Iwata, N., Saito, T., and Saido, T.C. (2013). Abeta secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep* 5, 61-69.
- Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S., and Forgac, M. (2003). Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms. *J Biol Chem* 278, 46396-46402.
- Ntsapi, C., Lumkwana, D., Swart, C., du Toit, A., and Loos, B. (2018). New Insights Into Autophagy Dysfunction Related to Amyloid Beta Toxicity and Neuropathology in Alzheimer's Disease. In *Int Rev Cell Mol Biol*, pp. 321-361.
- Okayama, H., and Chen, C. (1991). Calcium phosphate mediated gene transfer into established cell lines. In *Gene transfer and expression protocols*, E.J. Murray, ed. (Clifton: Humana Press), pp. 15-21.
- Rhodijs-Meester, H.F.M., Liedes, H., Koene, T., Lemstra, A.W., Teunissen, C.E., Barkhof, F., Scheltens, P., van Gils, M., Lotjonen, J., and van der Flier, W.M. (2018). Disease-related determinants are associated with mortality in dementia due to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 10, 23.
- Segura, M.M., Mangion, M., Gaillet, B., and Garnier, A. (2013). New developments in



lentiviral vector design, production and purification. *Expert Opin Biol Ther* 13, 987-1011.

Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595-608.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16, 869-871.

Smith, A.N., Francis, R.W., Sorrell, S.L., and Karet, F.E. (2008). The d subunit plays a central role in human vacuolar H(+)-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 40, 371-380.

Soscia, S.J., Kirby, J.E., Washicosky, K.J., Tucker, S.M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M.A., Goldstein, L.E., Duong, S., Tanzi, R.E., *et al.* (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5, e9505.

Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-441.

Wakabayashi, T., Craessaerts, K., Bammens, L., Bentahir, M., Borgions, F., Herdewijn, P., Staes, A., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Rubinstein, E., *et al.* (2009).



Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat Cell Biol* *11*, 1340-1346.

Wang, B.J., Her, G.M., Hu, M.K., Chen, Y.W., Tung, Y.T., Wu, P.Y., Hsu, W.M., Lee, H.,

Jin, L.W., Hwang, S.L., *et al.* (2017). ErbB2 regulates autophagic flux to modulate the proteostasis of APP-CTFs in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, E3129-E3138.

Wang, B.J., Wu, P.Y., Chen, Y.W., Chang, Y.T., Bhore, N., Wu, P.F., and Liao, Y.F.

(2018). Quantitative Measurement of gamma-Secretase-mediated Amyloid Precursor Protein and Notch Cleavage in Cell-based Luciferase Reporter Assay Platforms. *J Vis Exp* *131*, e56795.

Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A.S., Banerjee, S., Kong, D., and Sarkar, F.H.

(2010). Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* *1806*, 258-267.

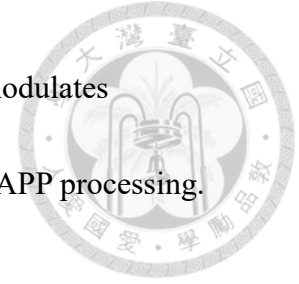
Wattmo, C., Londos, E., and Minthon, L. (2014). Risk factors that affect life expectancy

in Alzheimer's disease: a 15-year follow-up. *Dement Geriatr Cogn Disord* *38*, 286-299.

Wortmann, M. (2012). Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and

World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* *4*, 40.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q.,



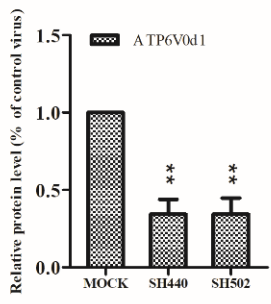
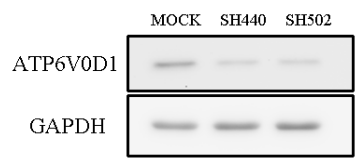
Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., *et al.* (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.

Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., *et al.* (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.

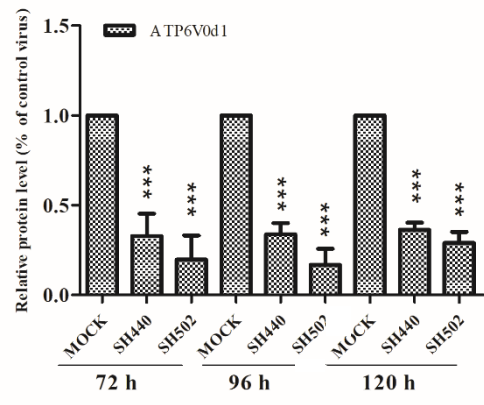
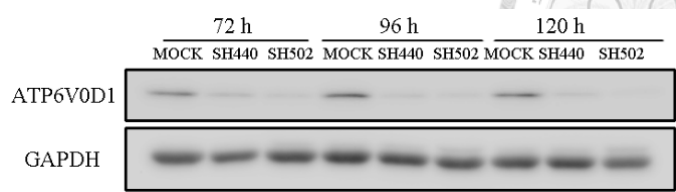
Yu, W.H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B.T., Cuervo, A.M., and Nixon, R.A. (2004). Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2531-2540.



(A)

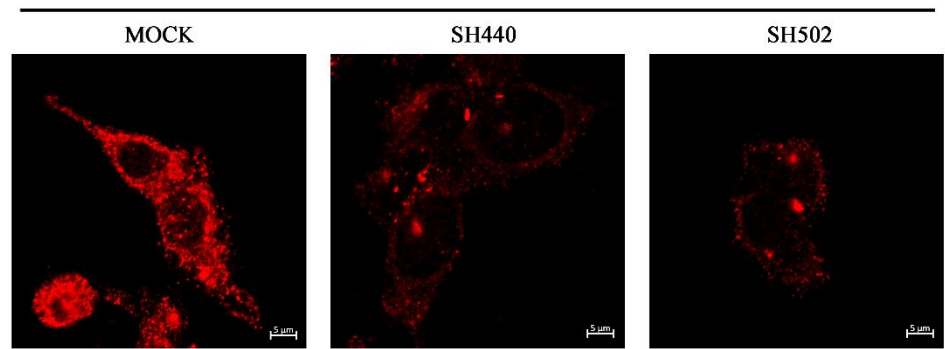


(B)



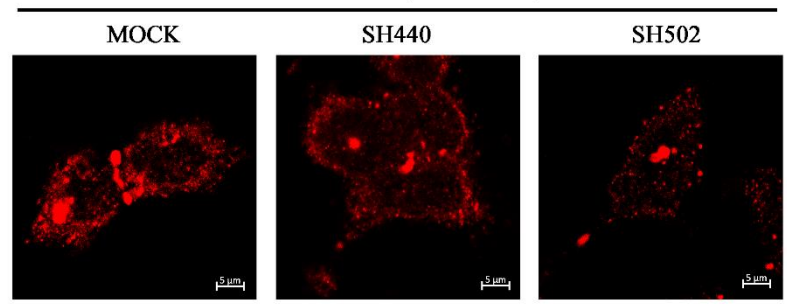
(C)

ATP6V0d1 (HEK cell)



(D)

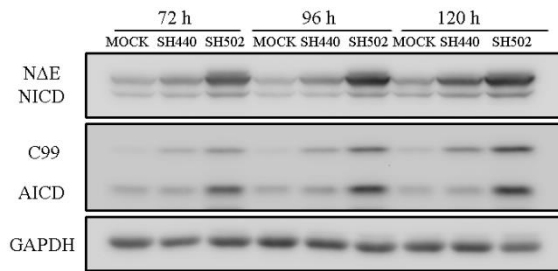
ATP6V0d1 (CCNY cell)



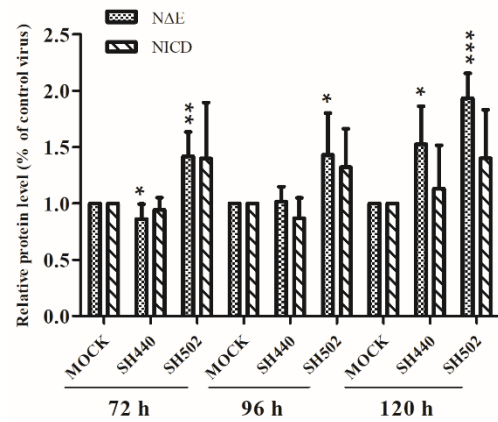
圖一、分別在 HEK293 細胞株及 CCNY 細胞株中驗證抑制 ATP6V0d1 基因表現之效果。

利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 分別感染以抑制細胞中 ATP6V0d1 之基因表現，並以 puromycin 篩選成功感染之細胞。(A) 在 HEK293 細胞中進行感染及篩選後收集細胞裂解液，所得之 Western Blot 結果圖及以 GAPDH 表現量進行標準化後的量化圖， $n = 3$ ，** $p < 0.01$ (means \pm SD)。(B) 在 CCNY 細胞中進行感染及篩選後收集不同時間點的細胞裂解液，所得之 Western Blot 結果圖及以 GAPDH 表現量進行標準化後的量化圖， $n = 6$ ，*** $p < 0.001$ (means \pm SD)。(C) 在 HEK293 細胞株中進行慢病毒感染及 puromycin 篩選後，利用 Anti-ATP6V0d1 進行免疫螢光染色，並以共軛焦顯微鏡拍攝，使用 Alexa Fluor 546 Anti-mouse IgG (H+L) 作為螢光二級抗體。(D) 在 CCNY 細胞株中進行慢病毒感染及 puromycin 篩選後，利用 Anti-ATP6V0d1 進行免疫螢光染色，並以共軛焦顯微鏡拍攝，使用 Alexa Fluor 647 Anti-mouse IgG (H+L) 作為螢光二級抗體。

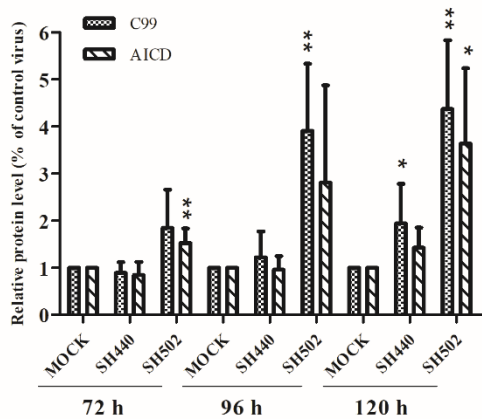
(A)



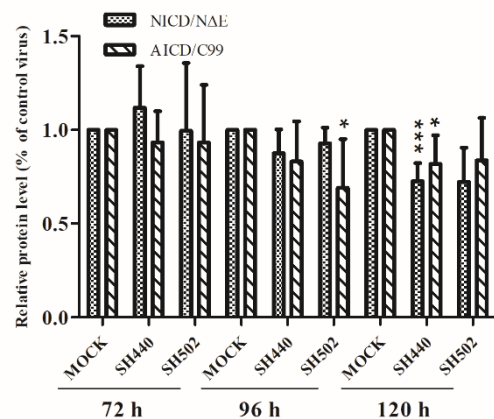
(B)



(C)



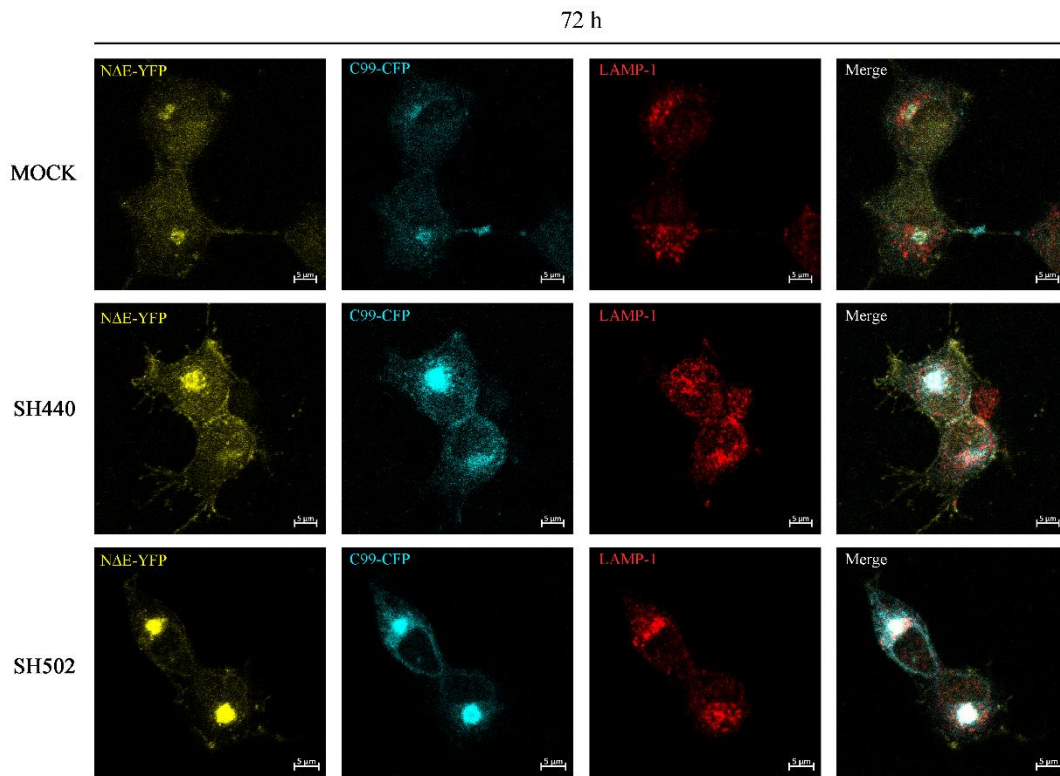
(D)



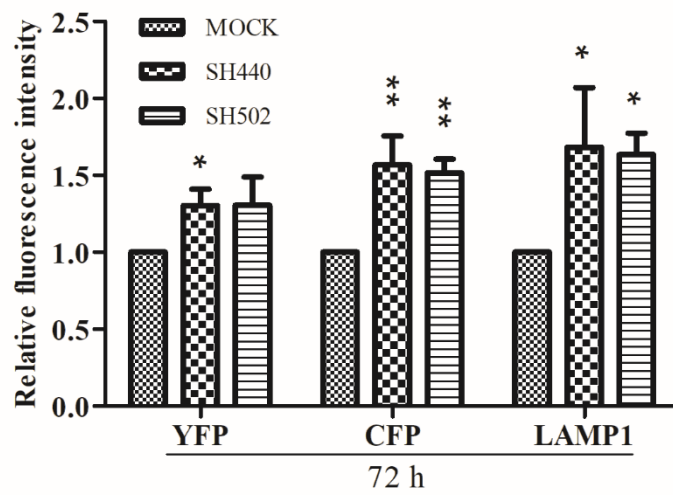
圖二、抑制 ATP6V0d1 基因表現後， γ -secretase 的受質及產物皆有累積。

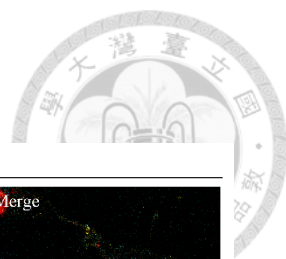
在 CCNY 細胞株中利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 分別感染以抑制細胞中 ATP6V0d1 之基因表現，並以 puromycin 篩選後，在不同時間點收集細胞裂解液。(A) 以西方墨點法確認 γ -secretase 的受質及產物在細胞中的含量變化，利用 Anti-GFP 偵測細胞中 YFP 及 CFP 訊號，並以分子量來區辨各種分子。(B) 以 GAPDH 表現量進行標準化後的 NΔE 和 NICD 在細胞中的含量變化， $n = 6$ ，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (means \pm SD)。(C) 以 GAPDH 表現量進行標準化後的 C99 及 AICD 在細胞中的含量變化， $n = 6$ ，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (means \pm SD)。(D) 利用受質與產物的比值來估算 γ -secretase 的相對活性， $n = 6$ ，* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (means \pm SD)。

(A)

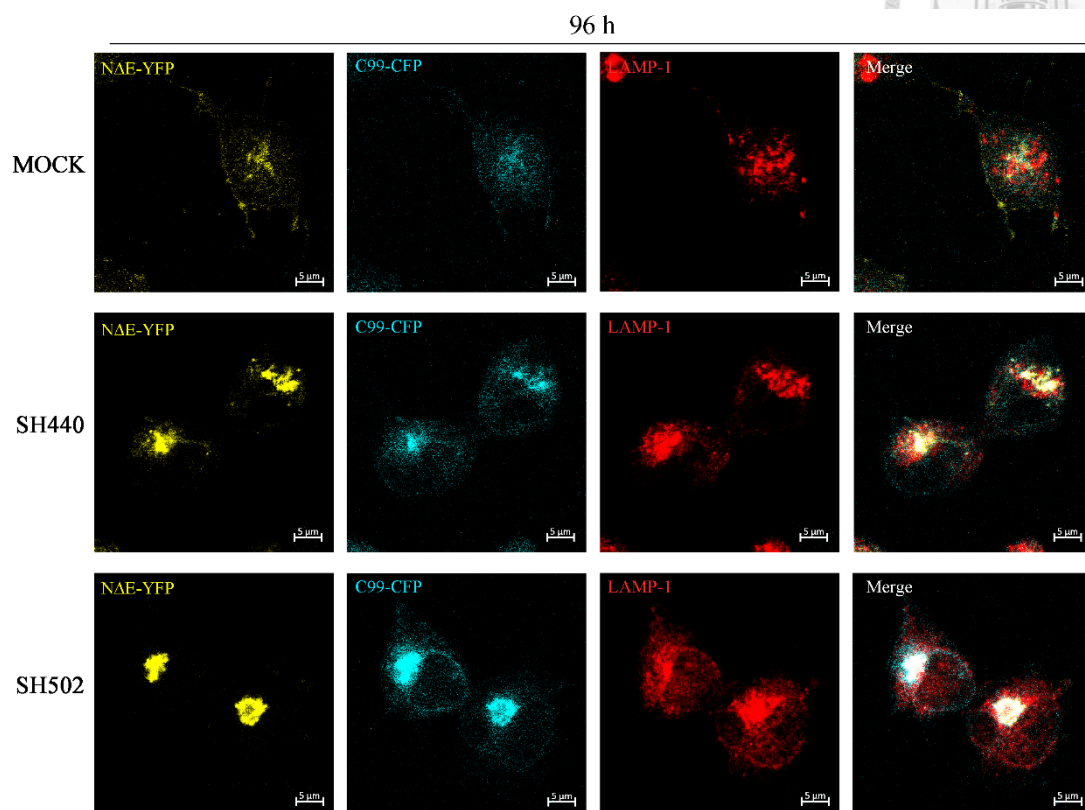


(B)

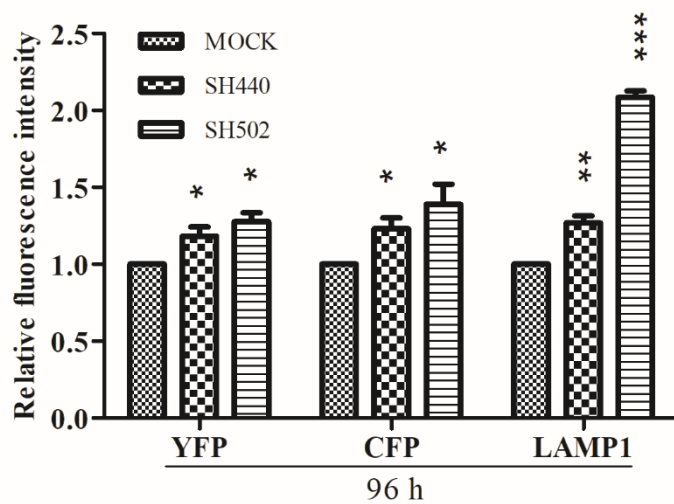


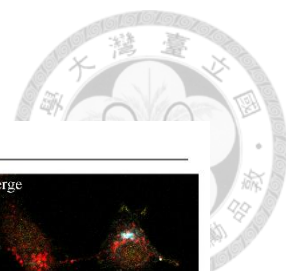


(C)

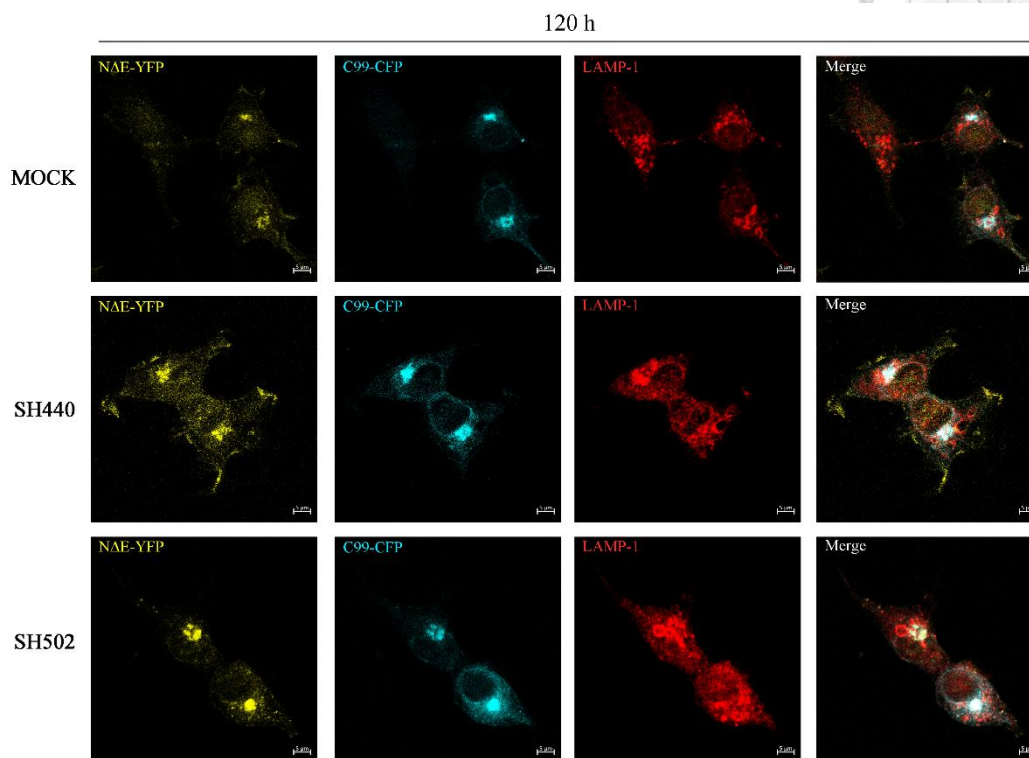


(D)

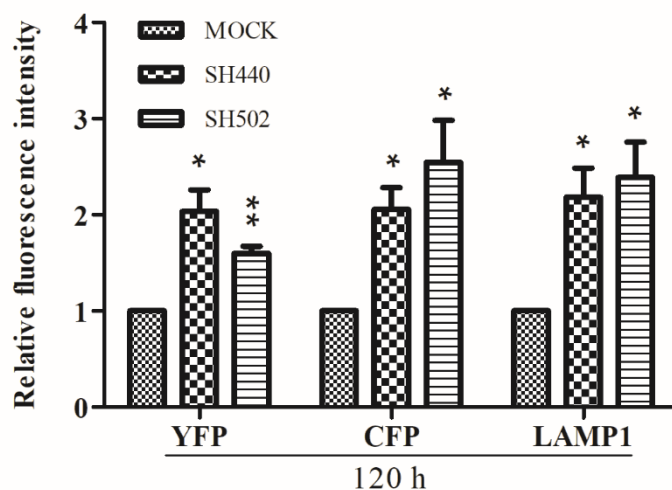




(E)



(F)

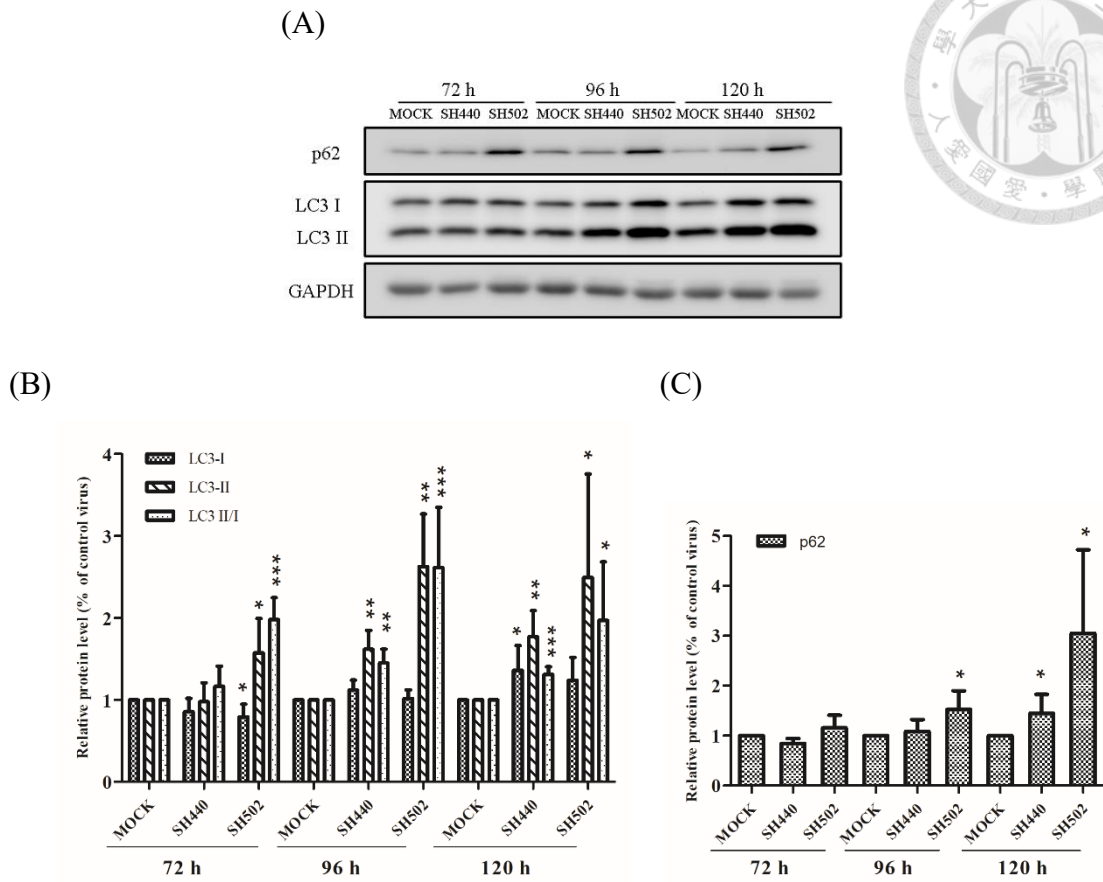


圖三、抑制 ATP6V0d1 基因表現後，整體 YFP、CFP 和 LAMP1 的螢光訊號皆出現上升趨勢。

在 CCNY 細胞株中進行對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 分別感染及 puromycin 篩選後，利用 Anti-LAMP1 及 Alexa Fluor 647 Anti-mouse IgG (H+L) 進行免疫螢光染色，以共軛焦顯微鏡拍攝。(黃螢光：YFP、藍螢光：CFP、

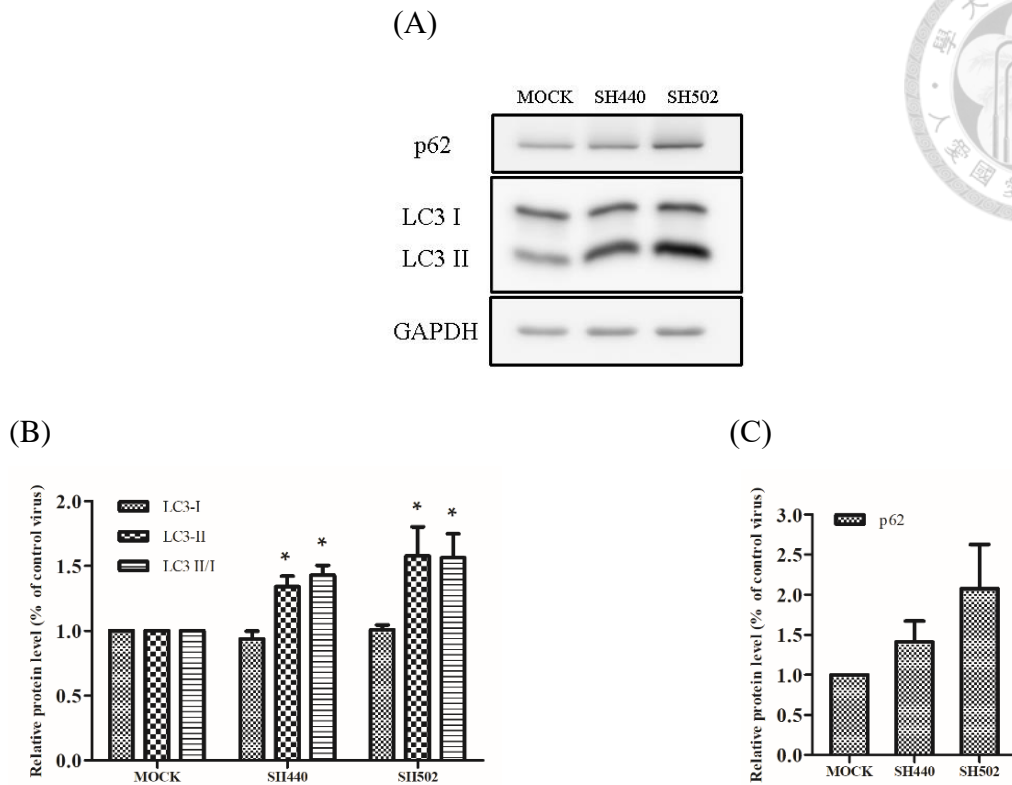
紅螢光：LAMP1)

(A) 慢病毒感染 72 小時後進行免疫螢光染色。(B) A 之螢光訊號量化結果， $n = 3$ ， $* p < 0.05$ ， $** p < 0.01$ (means \pm SD)。(C) 慢病毒感染 96 小時後進行免疫螢光染色。(D) C 之螢光訊號量化結果， $n = 3$ ， $* p < 0.05$ ， $** p < 0.01$ ， $*** p < 0.001$ (means \pm SD)。(E) 慢病毒感染 120 小時後進行免疫螢光染色。(F) E 之螢光訊號量化結果， $n = 3$ ， $* p < 0.05$ ， $** p < 0.01$ (means \pm SD)。



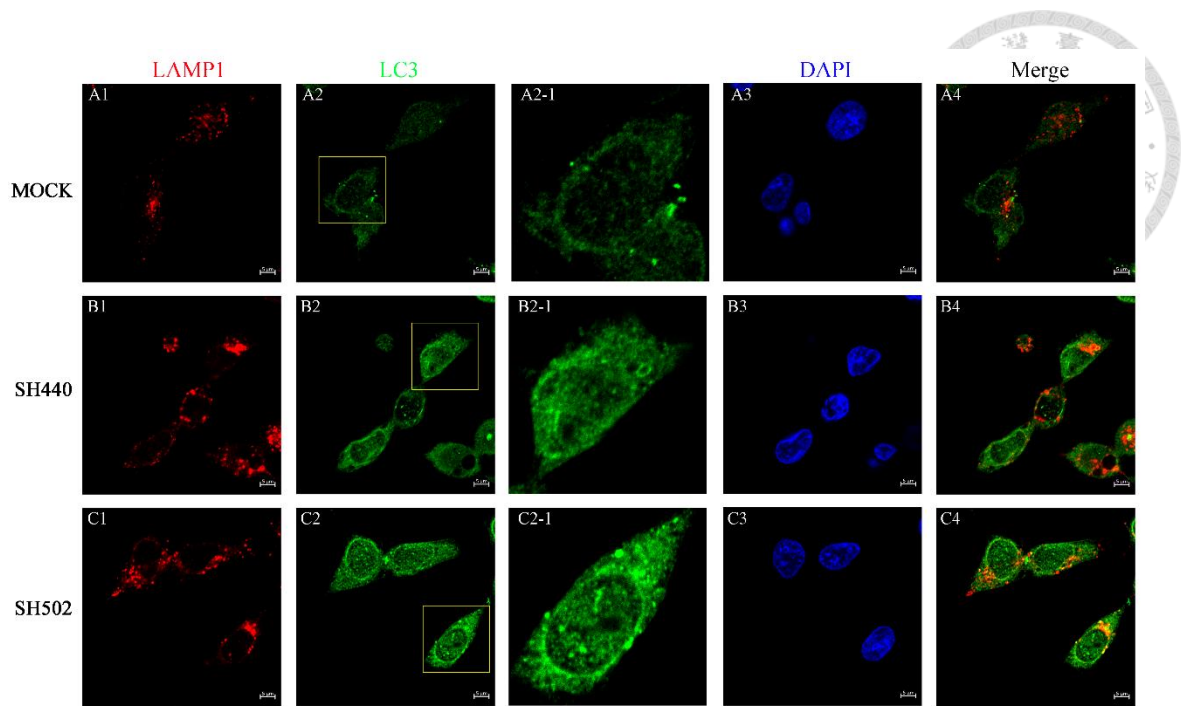
圖四、細胞自噬作用的指標蛋白 LC3 及 p62 在抑制 ATP6V0d1 基因表現後皆明顯上升。

在 CCNY 細胞株中利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 分別感染以抑制細胞中 ATP6V0d1 之基因表現，並用 puromycin 篩選後，在不同時間點收集細胞裂解液。(A) 以自噬作用指標蛋白 Anti-LC3 及 Anti-p62 來偵測細胞內自噬作用的情況。(B) 分別以 GAPDH 表現量進行標準化後計算 LC3-I、LC3-II 及 LC3-II/LC3-I 的數值並製作量化圖， $n = 6$ ，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ (means \pm SD)。(C) 以 GAPDH 表現量進行標準化後的 p62 蛋白在細胞中的含量變化， $n = 6$ ，* $p < 0.05$ (means \pm SD)。



圖五、在 HEK293 細胞株中抑制 ATP6V0d1 基因表現後，細胞自噬指標蛋白出現相似的上升趨勢。

在 HEK293 細胞株中利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 分別感染以抑制細胞中 ATP6V0d1 之基因表現，並以 puromycin 篩選 2 天後收集細胞裂解液。(A) 以自噬作用指標蛋白 Anti-LC3 及 Anti-p62 來偵測細胞內自噬作用的情況。(B) 分別以 GAPDH 表現量進行標準化後計算 LC3-I、LC3-II 及 LC3-II/LC3-I 的數值並製作量化圖， $n = 3$ ，* $p < 0.05$ (means \pm SD)。(C) 以 GAPDH 表現量進行標準化後的 p62 蛋白在細胞中的含量變化， $n = 3$ (means \pm SD)。



圖六、抑制 ATP6V0d1 基因表現後，LC3 和 LAMP1 之螢光訊號有更明顯的共定位現象。

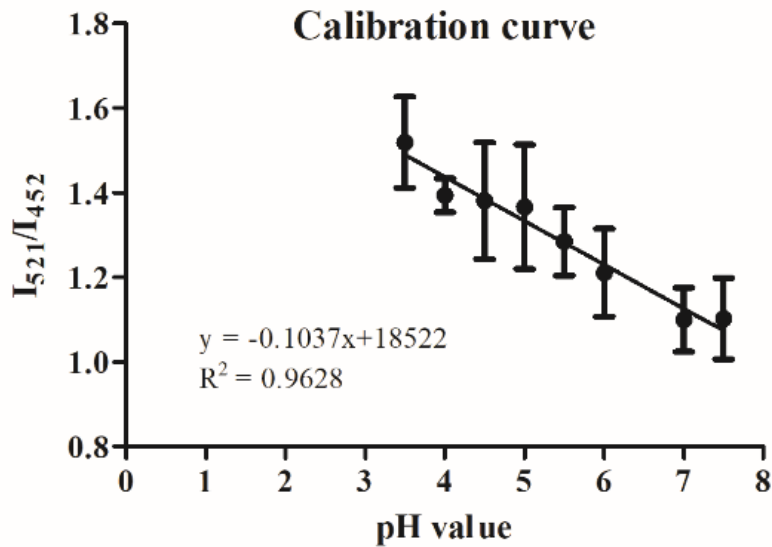
利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 在 HEK293 細胞株中分別感染，並以 puromycin 篩選 2 天後，藉自噬小體標記蛋白 LC3 和溶酶體標記蛋白 LAMP1 的雙重免疫染色來觀察兩種標記蛋白的螢光強度及共定位現象。

(A) 對照組慢病毒株之螢光結果，A1 為 LAMP1 之螢光圖，A2 為 LC3 之螢光圖，A2-1 為 A2 中黃框部分的放大圖，A3 為 DAPI 之螢光圖，A4 則為 A1 和 A2 的 merge 圖。(B) 以 SH440 慢病毒株抑制 ATP6V0d1 基因表現後之螢光結果圖，B1 為 LAMP1 之螢光圖，B2 為 LC3 之螢光圖，B2-1 為 B2 中黃框部分的放大圖，B3 為 DAPI 之螢光圖，B4 則為 B1 和 B2 的 merge 圖。(C) 以 SH502 慢病毒株抑制 ATP6V0d1 基因表現後之螢光結果圖，C1 為 LAMP1 之螢光圖，C2 為 LC3 之螢光圖，C2-1 為 C2 中黃框部分的放大圖，C3 為 DAPI 之螢光圖，C4 則為 C1 和 C2 的 merge 圖。

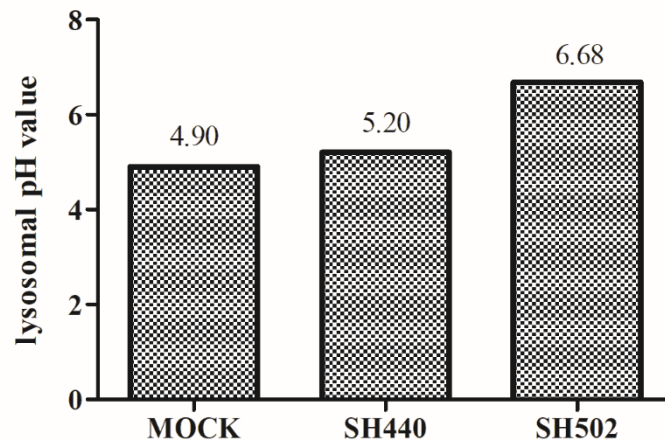
分別利用 Anti-LAMP1、Anti-LC3 和 Alexa Fluor 546 Anti-mouse IgG (H+L)、Anti-LC3 和 Alexa Fluor 488 Anti-rabbit IgG (H+L) 進行免疫螢光染色。



(A)



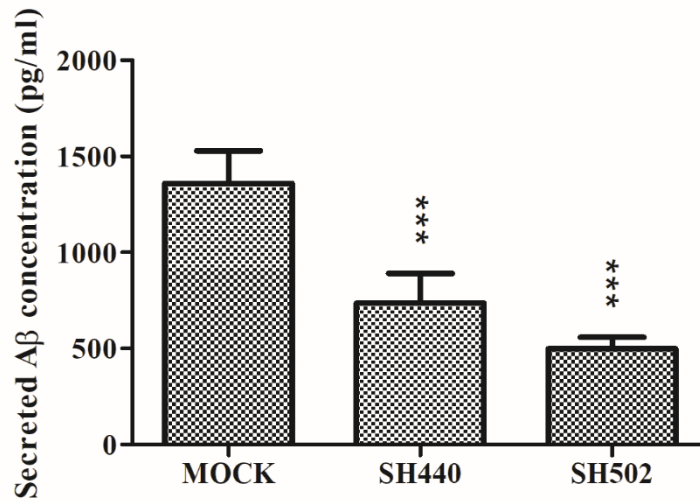
(B)



圖七、抑制 ATP6V0d1 基因表現後，溶酶體內部酸鹼度出現略微的上升趨勢。

利用 lysosensor 偵測細胞中溶酶體內的酸鹼值，以 335 nm 進行激發後讀取 452 nm 和 521 nm 的發射光強度，並計算 I_{521}/I_{452} 的數值。(A) 配置 8 種酸鹼值介於 pH 3.5 – pH 7.5 的 MES 緩衝溶液用以建立校正曲線。(B) 利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 在 HEK293 細胞株中分別感染，並以 puromycin 篩選 2 天後，偵測各種處理下所測得之 I_{521}/I_{452} ，並帶入校正曲線中算出其酸鹼值。

n = 1。



圖八、抑制 ATP6V0d1 基因表現後，胞外 A β ₄₀的濃度呈現下降趨勢。

收集細胞培養液並以 Human A β ₄₀ ELISA Kit 來測量培養液中 A β ₄₀ 的濃度。利用對照組慢病毒株 MOCK、慢病毒株 SH440、慢病毒株 SH502 在 HEK293 細胞株中分別感染，並以 puromycin 篩選 3 天後，將培養液換成含有 5 mM HEPES 之培養液，隔天收取培養液並進行 A β ₄₀ 濃度測定。n = 4, *** p < 0.001 (means \pm SD)。