

文章编号: 1004-0374(2010)09-0906-07

γ -分泌酶组件蛋白Nicastrin的研究进展

龙志敏, 贺桂琼*

(重庆医科大学神经科学研究中心, 人体解剖教研室, 重庆 400016)

摘要: Nicastrin(NCT)是高度糖基化的I型跨膜蛋白,是 γ -分泌酶复合物的重要组件蛋白之一,广泛分布于人类或鼠的所有细胞类型。它不仅与 γ -分泌酶的组装和成熟密切相关,其构象及表达变化对 γ -分泌酶活性和阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中 β 淀粉样蛋白(amyloid protein β , A β)的产生及降解也起重要调节作用。本文就国际上近几年在NCT的结构、合成、分布、降解及功能等方面的研究进展作一综述。

关键词: Nicastrin; γ -分泌酶; β 淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病

中图分类号: R745.7; R322.85 **文献标识码:** A

Progress in the research on Nicastrin, one of essential subunits of γ -secretase

LONG Zhi-min, HE Gui-qiong*

(Department of Anatomy, Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Nicastrin(NCT), one of the most important components of γ -secretase, is a highly glycosylated type I transmembrane glycoprotein. It is expressed in almost all cell types in human and mouse. NCT is not only closely related to the assembly and maturation of γ -secretase complex, more importantly, changes of its conformation and expression have a significant effect on the regulation of γ -secretase activity, as well as the generation and degradation of amyloid β peptide in Alzheimer's disease. This review summarizes the development of structure, synthesis, distribution, degradation and function of NCT in recent years, including that in our laboratory.

Key words: nicastrin; γ -secretase; amyloid β peptide; Alzheimer's disease

γ -分泌酶是一种非典型天冬氨酸蛋白酶,负责多种I型跨膜蛋白(如APP、Notch等)在细胞膜内的水解。 γ -分泌酶作用于APP水解的终末阶段,其直接产物A β 通过级联反应形成阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要病理产物老年斑(senile plaques, SP)。最近研究显示 γ -分泌酶活性的抑制降低了A β 的产生,减少了氧化应激,增强了线粒体活性,并导致细胞凋亡易感性的降低,因此抑制 γ -分泌酶是治疗AD的一个理想的药理学靶点^[1]。然而, γ -分泌酶是一个高相对分子质量多组件蛋白复合体,由早老素(presenilin, PS)、Aph-1、Pen2和Nicastrin(NCT)四种蛋白质构成^[2],该复合体的结构和功能

至今尚未完全阐明。现已证实,PS是 γ -分泌酶的活性中心^[3,4],但增加PS的表达并不能提高 γ -分泌酶的活性, γ -分泌酶活性还依赖于细胞内另外一些组分。并且,PS的活性也受 γ -分泌酶其他组分的调控,其中最为密切的就是NCT^[5]。那么,作为

收稿日期: 2010-03-12; 修回日期: 2010-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700885); 教育部重点项目资助计划(209102); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ090328); 重庆市首批高等学校优秀人才资助计划(渝教人[2009]2号)

*通讯作者: E-mail:guiqionghe@hotmail.com; Tel: 023-68485763

γ -分泌酶复合物的另一重要组件蛋白NCT, 它与 γ -分泌酶及AD中的 $A\beta$ 又有怎样密切的关系呢? 因此, 全面探讨NCT的结构、合成、代谢、功能及其与AD的关系, 对揭示AD发病的新机制具有重要意义。

1 NCT的产生与分布

NCT又称Aph-2, 首先在秀丽隐杆线虫(*Caenorabditis elegans*)中发现蛋白Aph-2参与Notch信号传导, 后在人类中发现与其同源的蛋白, Yu等^[6]将其命名为Nicastrin。它是以意大利的村庄“Nicastro”命名的, 人们在这里首次发现了家族性阿尔茨海默病(familial Alzheimer's disease, FAD)家族。NCT主要由成纤维细胞和神经元合成, 在体内广泛分布。Hebert等^[7]发现小鼠不同组织中NCT mRNA的表达水平不同, 在小鼠肝脏、心脏、肾脏和睾丸中表达最高, 在骨骼肌中表达最少, 而在脑中表达水平一般。关于NCT在脑内的分布, Kodam等^[8]证实NCT既表达于易发生AD病理改变的脑区(如大鼠皮质、海马), 也表达于相对不易产生老年斑的脑区(如纹状体、小脑); 该小组还发现NCT在新生大鼠脑内表达相对较高, 而后逐渐下降达到成年鼠水平。在新生大鼠中, NCT主要分布于神经元胞体, 而后随着大鼠的发育, 一部分NCT逐渐被运输到中枢神经系统的树突和神经纤维网。进一步研究发现, NCT蛋白在不同组织中的表达水平与其mRNA水平是平行的, 并且, NCT和 γ -分泌酶其他各组分的mRNA水平和蛋白水平分布呈正协同性, 即同时高或同时低。对于各组分mRNA转录调控的组织特异性, 不少学者从胚胎发育角度去探索原因: 如肝脏、心脏、肾脏来自内胚层, 脑来自外胚层, 骨骼肌来自中胚层, 而 γ -分泌酶四种组分的分布恰好与之相符。在转录后水平上的一致性表明, γ -分泌酶四种组分共存于同一个复合物中, 并且受到严格调控。

在亚细胞水平, 绝大多数NCT分布于高尔基体外侧网络(trans-Golgi network, TGN), 少数分布于内质网, 极少数分布于溶酶体、线粒体、细胞膜等结构^[9]。NCT在亚细胞水平的分布会影响不同形式 $A\beta$ 的产生。 $A\beta$ 主要存在两种形式, $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$, 正常情况下两者的比例为10:1; 但当 $A\beta_{42}$ 生成过多, $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 比例失调, 便导致老年斑的形成以及AD的发生。Morais等^[10]认为细胞膜富含NCT的细胞主要产生分泌型 $A\beta$, 其中以 $A\beta_{40}$ 为

主; 而若细胞的线粒体、TGN和溶酶体所含的NCT发生突变则导致细胞内 $A\beta$ 的产生以 $A\beta_{42}$ 为主, 是形成老年斑的罪魁祸首。

2 NCT的结构

2.1 基因水平

NCT基因定位于1q22~q23(在D1S2595和D1S2844附近), 该区域是发生AD的高度敏感区, 尤其与散发性阿尔茨海默病(sporadic Alzheimer's disease, SAD)的发病密切相关^[11]。Dermaut等^[12]对NCT的基因序列校对后确认其基因组DNA(gDNA)全长15.9 kb, cDNA全长仅为2.9 kb, 而非过去认为的全部为外显子。NCT包含17个外显子, 所有外显子都有编码序列。研究提示, NCT的Asn263~Ala483区域是其功能结构域, 而Asp336~Ser340序列即DYIGS基序为其胞外功能区, 该基序对于PS和NCT之间的相互作用非常重要。在不同物种的NCT中, 这段序列也是保守的。人类NCT的DYIGS只能部分缓解美丽线虫的Aph-2(人类NCT的等位基因)突变导致的表型缺陷, 说明NCT的全部功能并不集中于这一结构域。NCT功能结构中心有一个与氨肽酶超家族成员类似的折叠区, 表明NCT功能结构中心亦属于氨肽酶超家族。NCT基因的启动子位于其翻译起始密码上游-432 bp~-133 bp区域^[13], 其上游启动序列多态性与AD的发生存在相关性的可能性较大。

关于NCT基因多态性(SNP)与AD的相关性研究, 目前已有不少报道。Dermaut等^[12]对荷兰人群NCT基因外显子和内含子进行研究, 发现在家族性早发性AD患者中, 缺失ApoE ϵ 4等位基因的患者, 单体型“HapB”会增加AD患病风险。随后Helisalimi等^[14]对芬兰人相关性研究也得出了相同的结论。相反地, Cousin等^[15]的研究认为NCT与AD没有相关性。Ma等^[16]通过对中国北方汉族人群的调查发现启动子区存在3个SNP, 经遗传学分析发现, -1216A/C和-796T/G与SAD的遗传易感性相关。进行ApoE ϵ 4等位基因分层后, 在非ApoE ϵ 4等位基因携带者中此相关性存在, 但在ApoE ϵ 4等位基因携带者中此相关性不存在, 提示这两个位点独立于ApoE ϵ 4等位基因与SAD的发病相关。另外, 他们发现-1216C/A、-796G/T和-1216A/-796G之间分别存在连锁不平衡, 而单体型-1216C/-436C的AD发病风险增加, 单体型-1216A/-436C和-1216A/-796G的AD发病风险降低。但Orlacchio等^[17]的研究显示,

在意大利人群中NCT启动子区发现两个多态性位点：-1216C/A和-796T/G，经相关性、单体型分析后认为这两个SNP与AD的发病无相关性。这说明不同人群可能存在种族和地域的遗传异质性，另外也可能存在样本数量等原因造成的偏差，导致结论不一致。

2.2 蛋白质水平

NCT蛋白由709个氨基酸构成，目前证实NCT属于N端朝外、C端朝内的I型跨膜蛋白，N端→C端依次分为四部分(图1)：(1)信号肽；(2)长的N端亲水胞外域(ECD)，其中包括相对分子质量较大的保守的氨基酸序列DYIGS以及多个糖基化和磷酸化基团；(3)亲脂跨膜区(TMD)；(4)短的C端亲水型结构域^[18]。Nicastrin有三种形式，新生的NCT(约80 k)，经部分糖基化后成为不完全成熟的NCT(imNCT，约110 k)，完全糖基化后成为成熟的NCT(mNCT，约130 k)^[2]。imNCT完全转变成mNCT大概需要5 h，imNCT的半衰期短($t_{1/2} < 30$ min)，而mNCT的半衰期则较长($t_{1/2}$ 约为24 h)^[19]。

NCT的构象变化在 γ 分泌酶复合体激活及 $A\beta$ 产生中具有重要作用。Yu等^[6]首先报道了在NCT胞外域的保守DYIGS结构域上，人工缺失突变(NCT Δ 312-340和NCT Δ 312-369)可以降低总 $A\beta$ 分泌，而一对位点错义突变(D336A+Y337A)却增加了总 $A\beta$ 的产生和 $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 的比值。其后有报道称NCT的胞外域可以识别和结合 γ -分泌酶的底物，被称为 γ -分泌酶的“底物受体”^[20]。NCT插入 γ 分泌酶复合物是激活 γ 分泌酶和产生 $A\beta$ 的基本环节。Capell等^[21]研究表明，NCT跨膜区的N端区域是NCT的重要功能实体，NCT首先通过该区域与 γ 分泌酶其他组分相互作用，因此NCT的跨膜区对 γ 分泌酶的组装及功能的发挥尤为重要。

3 NCT蛋白的翻译后修饰

蛋白质翻译后修饰在生命体中作用重大。它使蛋白质的结构更为复杂，功能更为完善，调节更为精细，作用更为专一。常见的蛋白质翻译后修饰过程有糖基化、泛素化、磷酸化、脂基化、甲基化和乙酰化等。NCT蛋白在成熟的过程中也经过了复杂的翻译后修饰。

3.1 糖基化

NCT是一种高度糖基化蛋白，也是到目前为止发现的 γ -分泌酶复合体中惟一个经糖基化的蛋白^[22]。糖链连接形式为N型，NCT具有16个潜在的N型糖基化的位点，N-聚糖能结合在这些位点上。NCT首先在线粒体上形成内切糖苷酶-H-敏感(Endo-H-sensitive)的未糖基化蛋白(imNCT)，然后在高尔基体上经过复杂的糖基化修饰，形成抗内切糖苷酶-H(Endo-H-resistant)的成熟的NCT(mNCT)，但这些修饰作用在外源性过表达的NCT上未被观察到，因为当NCT外源性表达时，其糖基化很容易遭到破坏^[23]。He等^[24]也证实内源性的NCT以mNCT为主，而外源性的NCT主要为imNCT。原代神经元内的NCT主要为mNCT，而成纤维细胞中则含有相当部分的imNCT。NCT的糖基可以被内切糖苷酶H(Endo H)或者N-糖苷酶-F(PNGase F)去除。Endo H能移除高相对分子质量的甘露糖而PNGase F能去除所有与N端相连的低聚糖。经PNGase F消化后，NCT中心蛋白的相对分子质量大约为70 k，而Endo H消化能使NCT的相对分子质量减少20 k左右^[23]。

糖基化在许多生物过程中起着重要的作用，如免疫保护、病毒复制、细胞生长、炎症的产生等。NCT的低聚糖可能参与线粒体上一些多肽的正确折叠^[25]。糖蛋白的正确折叠需要一些经典的分子伴侣和催化二硫键形成的蛋白的作用，这些机制都与蛋

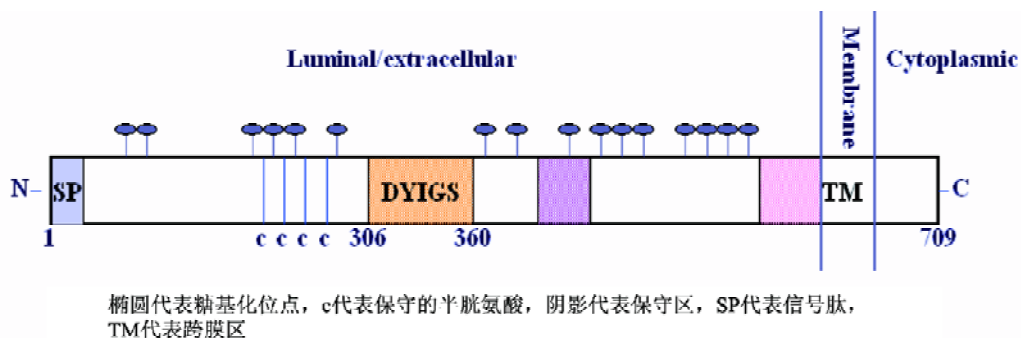


图1 Nicastrin结构示意图

白质折叠的质量控制有关,所以N-连接寡糖还参与质量控制体系^[26]。Morais等^[22]认为N-糖基化需要外源凝集素钙黏结合蛋白(CNX)和ERGIC-53的相互作用,有助于促进NCT外功能区的构象形成,帮助正确地识别底物。此外,N-连接寡糖还涉及糖蛋白的转运和靶向作用。用I型甘露糖苷酶抑制剂阻断NCT的糖基化, γ -分泌酶依然能分解APP和Notch,说明NCT外功能区复杂的糖基化只是促进 γ -分泌酶成熟,而并不是 γ -分泌酶活性所必需的^[27]。

3.2 其他修饰

NCT除上述的糖基化修饰外,还存在多种其他修饰。NCT膜脂质经过氧化反应产生4-hydroxy-nonenal(HNE)。NCT氧化修饰后可增加 γ -分泌酶与底物的结合,从而使 γ -分泌酶活性增强。He等^[24]用免疫共沉淀及免疫荧光双标发现NCT和泛素(Ubi)在细胞内相互作用形成NCT-Ubi复合物,说明NCT在降解之前经泛素化修饰,且其泛素化修饰不依赖于PS。泛素化对于细胞分化与凋亡、DNA修复、免疫应答和应激反应等生理过程起着重要作用。NCT的泛素化修饰是其被蛋白酶体降解的前提。

4 NCT的降解

蛋白质降解是细胞内调节蛋白质水平和功能的重要途径。真核细胞主要有蛋白酶体和溶酶体两条降解途径。蛋白酶体与泛素化信号系统一起构成的泛素-蛋白酶体途径(UPP)是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径,它涉及泛素、泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素-蛋白连接酶(E3)、26S蛋白酶体、泛素再循环酶的一系列反应。在该过程中,E3具有特异识别靶蛋白及连接E2的能力,在UPP中起决定性作用。UPP的功能缺陷与AD的发生密切相关^[28,29]。近年来国际上不少学者开始研究AD相关蛋白质的降解途径,以期发现参与AD发病的新机制。He等^[24]对NCT降解途径的研究发现蛋白酶体和溶酶体抑制剂均可使非神经细胞(HEK293)和神经细胞(SH-SY5Y)内NCT的蛋白降解受阻,NCT经泛素化修饰后被26S蛋白酶体降解,提示NCT(尤其是mNCT)的降解与蛋白酶体途径和溶酶体途径均有关。蛋白酶体抑制剂处理后细胞内mNCT增多,且主要聚集在线粒体和高尔基体;而溶酶体抑制剂处理后细胞内增加的NCT主要聚集在溶酶体。两类抑制剂对NCT的增强效应均呈剂量依赖性和时间依赖性。由于蛋白酶体途径主要降解半衰期短的正常蛋

白质和变性的、错误折叠的及过量表达的蛋白质,而溶酶体途径主要作用于半衰期长的细胞膜蛋白和内含蛋白,故推测蛋白酶体途径主要负责对合成和转运过程中错误折叠、受损的NCT蛋白的降解,而溶酶体主要负责维持NCT的更新。

5 NCT的功能

5.1 NCT在 γ -分泌酶组装中的作用

γ -分泌酶是一个由PS、Aph-1、Pen2和NCT四种蛋白质构成的多组件蛋白复合体,其中PS为 γ -分泌酶的蛋白质水解活性位点,其他三种蛋白质为其辅因子,只有四种物质同时表达,才能使PS更加稳定和增加完全糖基化的NCT表达,并且使 γ -分泌酶的活性显著增强。 γ -分泌酶各组分的组装主要在高尔基体外侧网络和内质网上完成^[30,31],而关于 γ -分泌酶的组装顺序目前尚不完全明确。Takasugi等^[32]提出了 γ -分泌酶各组分在时间上的组装模型:首先NCT与Aph-1结合形成二聚体,二聚体中未成熟的NCT在内质网中进行N型糖基化,随后部分新生的PS全蛋白(PS-f1)加入到二聚体上,形成稳定的三聚体,然后Pen-2加入,从而使PS-f1发生内部水解,最后NCT糖基化。LaVoie等^[33]证明Aph-1可以与imNCT或mNCT结合,但更倾向于与imNCT结合;而Pen-2倾向于与mNCT相互作用,表明Pen-2与Aph-1-NCT的结合在酶组装的后期,或者先于imNCT的完全糖基化。他们认为在早期 γ -分泌酶的组装中,Aph-1通过支架作用与imNCT结合,起到了稳定imNCT的作用,形成不成熟的 γ -分泌酶复合体。紧接着,PS、Pen-2先后结合到过渡态的酶复合体上,NCT成熟,PS-f1内部水解,最后形成了成熟的具有活性的 γ -分泌酶。然而,由于目前尚未观察到Pen-2进入 γ -分泌酶复合体的具体时相,也有研究认为在组装早期NCT与Aph-1结合形成支架,稳定PS全蛋白,而后PS加入 γ -分泌酶复合体后将Aph-1置换出 γ -分泌酶复合体^[34]。但是,不管如何,NCT在 γ -分泌酶复合物的组装中都起到了促进 γ -分泌酶复合体成熟和稳定的重要作用。

5.2 NCT与 γ -分泌酶其他组分的关系

Zhang等^[35]发现NCT对于 γ -分泌酶其他各组分的稳定及转运也至关重要。各组分只有组装完全并且正确作用时,才能进一步运输、成熟,否则将会被蛋白酶体、溶酶体降解。NCT缺乏,Aph-1、Pen-2及PS1-f1虽然也能在线粒体中形成少量的亚复

合体,但是大量的Aph-1脱离Pen-2/PS1-f1在线粒体中被蛋白酶体降解,部分Aph-1会经高尔基体送往蛋白酶体、溶酶体降解,而Pen-2/PS1-f1则被蛋白酶体降解。NCT缺乏导致Aph-1、Pen-2和有活性的PS1片段明显减少,而无活性的PS1-f1明显聚集,其中降低的Pen-2表达水平能被过度表达的PS1、Aph-1部分恢复,表明对于Pen-2的表达,NCT并不是必需的。在野生型细胞中, γ -分泌酶复合物定位于转高尔基体网络上,与之不同的是,在NCT敲除细胞中,Pen-2、Aph-1和PS1-f1都位于内质网上,这说明NCT对 γ 分泌酶中其他组分由线粒体运输到高尔基体中是必需的。

在 γ -分泌酶“四人家成员”中,NCT和PS的关系尤为密切。一方面,PS在NCT翻译后修饰、亚细胞水平的分布及保持NCT的稳定性方面均发挥重要作用。在亚细胞水平,NCT的分布与PS1有很大重叠性。Kimberly等^[36]发现在 γ -分泌酶组装过程中,当PS-f1缺失时,imNCT与 γ -分泌酶亚复合物结合受限,导致mNCT生成减少;当PS1和PS2缺失时,imNCT不能到达高尔基体中间膜囊,因此,不能完成末端糖基化的成熟过程,说明在 γ 分泌酶组装中PS-f1限制着NCT的结合量,使NCT的糖基化受到严格调控。此外,可以推测NCT经历了一个依赖PS1的构象改变,如蛋白质折叠过程,未完全折叠的和未完全成熟的NCT蛋白滞留在内质网中,随后被缓慢降解。PS1和PS2在NCT成熟过程中的作用并不相同。当PS1缺乏时,所有形式的NCT表达水平均显著地降低,其中最明显的是成熟的N型糖基化NCT的减少;而在PS2缺失的鼠中,成熟NCT表达水平的降低并不是很明显,而主要是imNCT的减少。因为在PS2缺失的个体内,PS1能够作用于imNCT,转化出接近正常水平的成熟NCT。相反,仅凭PS2自身并不能使NCT完全成熟^[37]。另一方面,NCT与PS的表达、稳定及转运有关。用RNA抑制剂耗竭内源性的NCT后发现,无论内源性的或转染的PS蛋白均完全消失,而此时PS的RNA表达水平无异常,表明NCT对蛋白质水平的PS起稳定作用。缺少了NCT, γ -分泌酶的其他组分主要定位于内质网。此时PS在内质网中堆积,而异位的PS很快被降解。当细胞中过度表达PS时,由于NCT等调节因子的相对不足,限制其代谢过程,造成PS全蛋白的堆积。此外,在NCT敲除细胞的质膜上,发现了一定数量的PS1,表明尚存在不依赖于NCT的PS转运机制^[35]。

5.3 NCT对 γ -分泌酶复合物及A β 的影响

虽然不少文献报道NCT的构象改变与 γ -分泌酶的活性紧密相关,但NCT的表达或表达水平的变化是否会影响 γ -分泌酶的活性,目前还有争议。此前有研究认为NCT在 γ -分泌酶中充当了“底物受体”^[6,20]。只有当NCT与相应的底物结合后,PS-f1才能稳定并转化为有活力的NCT/CTF异二聚体形式,推测NCT与 γ 分泌酶底物的结合可能是使PS内部剪切成有活性的 γ 分泌酶的先决条件。然而,最近Zhao等^[38]研究发现,NCT缺失时,由PS1/Pen2/Aph1三聚体组成的 γ 分泌酶也具有分解Notch和APP的活性,只是这个三聚体很不稳定,而NCT的加入正是稳定了 γ -分泌酶,但它并非 γ -分泌酶发挥活性的必要成分。实验还表明,单独过量表达NCT并不能增加 γ -分泌酶复合物的量,但是会影响 γ -分泌酶复合物的组装、稳定和转运,从而也会影响A β 的产生。随着对NCT降解途径研究的深入,增加NCT的降解来调控A β 的产生也得以实现。Maeda等^[39]报道NCT可作为Synoviolin——一种泛素连接酶(E3)的底物,Synoviolin与内源性imNCT的泛素化降解有关;Synoviolin的过表达使imNCT水平下降和A β 的生成增加。此外,Pardossi-Piquard等^[40]报道NCT缺乏可使Neprilysin酶的表达显著减少、膜结合活性和mRNA水平下降,而该酶是降解A β 的一个关键酶,这说明NCT还会影响A β 的降解。

6 NCT的抑制

既然NCT是 γ -分泌酶的重要组成成分,它对 γ -分泌酶和A β 均有影响,那可否通过选择性的调节NCT的表达,减少A β 的聚集,从而阻止或延缓AD中老年斑的生成呢?Hayashi等^[41]就报道了一种以A5201A为基础的单链可变区基因片段(SCFV)抗体,并将该抗体作为细胞内对抗NCT的抗体来抑制 γ -分泌酶活性。作用机理是:由于imNCT能与 γ -分泌酶其他组分结合形成复合物,而它们的相连主要依赖于NCT外功能区的完整性。A5201A抗体作为抗imNCT的细胞内单克隆抗体,不仅可对抗NCT的胞外域(ECD),还可阻止NCT蛋白的正常折叠及其胞外域糖基化的成熟,结果导致 γ -分泌酶的组装受阻,不能形成有活性的 γ -分泌酶。另外,Spasic等^[42]还发现Rer1p作为一个新型限制因子,同Aph-1竞争与NCT的结合位点,从而负性调节 γ -分泌酶在线粒体和高尔基体上的组装。这些对于AD的防

治具有潜在的应用价值。

7 小结

综上所述, NCT 作为 γ -分泌酶复合物的重要组件蛋白之一, 与 γ -分泌酶的组装及成熟密切相关, 其构象改变和蛋白表达水平变化对 γ -分泌酶及其他组件密切相关, 并对 AD 中 A β 的产生和降解起重要调节作用。目前对 NCT 各方面的研究已取得了不少进展, 相信随着研究的深入, NCT 有望成为新的治疗靶点, 为 AD 的有效防治提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Sheng B, Gong K, Niu Y, et al. Inhibition of γ -secretase activity reduces A β production, reduces oxidative stress, increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(10): 1362-75
- [2] De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron*, 2003, 38(1): 9-12
- [3] De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 1998, 391(6665): 387-90
- [4] Herreman A, Serneels L, Annaert W, et al. Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7): 461-2
- [5] Annaert W, De Strooper B. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, 18: 25-51
- [6] Yu G, Nishimura M, Arawaka S, et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*, 2000, 407(6800): 48-54
- [7] Hebert SS, Serneels L, De Jaegere T, et al. Coordinated and widespread expression of γ -secretase *in vivo*: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(2): 260-72
- [8] Kodama A, Vetrivel KS, Thinakaran G, et al. Cellular distribution of γ -secretase subunit nicastrin in the developing and adult rat brains. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(5): 724-38
- [9] Confaloni A, Crestini A, Albani D, et al. Rat nicastrin gene: cDNA isolation, mRNA variants and expression pattern analysis. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 136(1-2): 12-22
- [10] Morais VA, Leight S, Pijak DS, et al. Cellular localization of Nicastrin affects amyloid β species production. *FEBS Lett*, 2008, 582(3): 427-33
- [11] Hiltunen M, Mannermaa A, Thompson D, et al. Genome-wide linkage disequilibrium mapping of late-onset Alzheimer's disease in Finland. *Neurology*, 2001, 57(9): 1663-8
- [12] Dermaut B, Theuns J, Sleegers K, et al. The gene encoding nicastrin, a major γ -secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(6): 1568-74
- [13] Yang M, Cai F, Wang RS, et al. Identification and clone of human Alzheimer's disease related gene nicastrin promoter. *J Cent South Univ Technol: Med Sci ed*, 2006, 31(1): 9-13
- [14] Helisalmi S, Dermaut B, Hiltunen M, et al. Possible association of nicastrin polymorphisms and Alzheimer disease in the Finnish population. *Neurology*, 2004, 63(1): 173-5
- [15] Cousin E, Hannequin D, Mace S, et al. No replication of the association between the Nicastrin gene and familial early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2003, 353(2): 153-5
- [16] Ma Z, Han D, Zuo X, et al. Association between promoter polymorphisms of the nicastrin gene and sporadic Alzheimer's disease in North Chinese Han population. *Neurosci Lett*, 2009, 458(3): 136-9
- [17] Orlacchio A, Kawarai T, Polidoro M, et al. Lack of association between Alzheimer's disease and the promoter region polymorphisms of the nicastrin gene. *Neurosci Lett*, 2004, 363(1): 49-53
- [18] Arawaka S, Hasegawa H, Tandon A, et al. The levels of mature glycosylated nicastrin are regulated and correlate with γ -secretase processing of amyloid β -precursor protein. *J Neurochem*, 2002, 83(5): 1065-71
- [19] Edbauer D, Winkler E, Haass C, et al. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 8666-71
- [20] Shah S, Lee SF, Tabuchi K, et al. Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor. *Cell*, 2005, 122(3): 435-47
- [21] Capell A, Kaether C, Edbauer D, et al. Nicastrin interacts with γ -secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52519-23
- [22] Morais VA, Brito C, Pijak DS, et al. N-glycosylation of human nicastrin is required for interaction with the lectins from the secretory pathway calnexin and ERGIC-53. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(9): 802-10
- [23] Herreman A, Van Gassen G, Bentahir M, et al. γ -secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 6): 1127-36
- [24] He G, Qing H, Tong Y, et al. Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome. *J Neurochem*, 2007, 101(4): 982-92
- [25] Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, 1999, 286(5446): 1882-8
- [26] Trombetta ES, Helenius A. Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 1999, 18(12): 3282-92
- [27] Chavez-Gutierrez L, Tolia A, Maes E, et al. Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for γ -secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20096-105
- [28] Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ*, 2005, 12(9): 1178-90

- [29] Song S, Jung YK. Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system. *Trends Mol Med*, 2004, 10(11): 565-70
- [30] Baulac S, LaVoie MJ, Kimberly WT, et al. Functional γ -secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and γ -secretase substrates. *Neurobiol Dis*, 2003, 14(2): 194-204
- [31] Kim SH, Yin YI, Li YM, et al. Evidence that assembly of an active γ -secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48615-9
- [32] Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, et al. The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature*, 2003, 422(6930): 438-41
- [33] LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, et al. Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37213-22
- [34] Hu Y, Fortini ME. Different cofactor activities in γ -secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J Cell Biol*, 2003, 161(4): 685-90
- [35] Zhang YW, Luo WJ, Wang H, et al. Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/ γ -secretase components. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17020-6
- [36] Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, et al. Complex N-linked glycosylated nicastrin associates with active γ -secretase and undergoes tight cellular regulation. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35113-7
- [37] Chen F, Tandon A, Sanjo N, et al. Presenilin 1 and presenilin 2 have differential effects on the stability and maturation of nicastrin in mammalian brain. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 19974-9
- [38] Zhao G, Liu Z, Ilagan MX, et al. γ -secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *J Neurosci*, 2010, 30(5): 1648-56
- [39] Maeda T, Marutani T, Zou K, et al. An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin, is involved in the degradation of immature nicastrin, and regulates the production of amyloid β -protein. *FEBS J*, 2009, 276(26): 5832-40
- [40] Pardossi-Piquard R, Dunys J, Yu G, et al. Neprilysin activity and expression are controlled by nicastrin. *J Neurochem*, 2006, 97(4): 1052-6
- [41] Hayashi I, Takatori S, Urano Y, et al. Single chain variable fragment against Nicastrin inhibits the γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 2009, 284(41): 27838-47
- [42] Spasic D, Raemaekers T, Dillen K, et al. Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates γ -secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol*, 2007, 176(5): 629-40