

國立臺灣大學醫學院藥學研究所

碩士論文



Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討克林黴素對細胞自噬與 APP 水解的影響

Investigation of the Effect of Clindamycin
on Autophagy and APP Processing

陳淳于

Chwen-Yu Chen

指導教授：孔繁璐 博士

Advisor: Fan-Lu Kung, Ph.D.

中華民國一〇六年一月

January, 2017



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

探討 Clindamycin 對 Autophagy 與
APP Processing 的影響

Investigation of the Effect of Clindamycin
on Autophagy and APP Processing

本論文係陳淳于 (R03426019) 在國立臺灣大學藥學所完成之碩士學位論文，於民國 106 年 1 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

孔敬琳 (指導教授簽名)

許麗卿

柯凌偉

系主任、所長

沈麗娟 (簽名)

摘要



阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)是一類廣受重視的漸進式神經退化性疾病，其在組織病理學的特徵之一為老年斑塊。在以往的研究指出，老年斑塊主要由具有細胞毒性的 A β 的堆積所形成的。而 A β 則是 APP 進行 β processing，經由 β -secretase 和 γ -secretase 水解後所得的產物。A β 的生成與堆積被認為與許多因素有關，其中之一是細胞自噬。

細胞自噬是細胞在處於挨餓環境下，藉由分解一些次要的蛋白質或胞器，以應付需要和維持細胞存活的機制。近年來科學家發現，細胞自噬不僅發生在細胞營養缺乏的情況，也會在受到外來刺激或輻射導致有胞器受損(如粒線體)而威脅細胞存活時觸發，能避免細胞進行細胞凋亡而有自我保護的功用。許多與阿茲海默氏症的相關的研究中指出，當誘發細胞自噬時，會造成 APP 水解產物 A β 生成量減少以及幫助清除 A β 的堆積。至於細胞自噬如何影響 A β 的生成與堆積，甚至如何調控 APP 的水解途徑，目前仍然不是很明確。

本研究觀察在使用克林黴素(clindamycin)之下，對於 GBM8401 與 SH-SY5Y 兩種細胞株細胞自噬的影響。從西方墨點法的結果發現，GBM8401 與 SH-SY5Y 中的 LC3-II 的量皆有明顯的上升，表示在克林黴素的作用下，兩種細胞株都有細胞自噬的發生。另外，本研究也觀察了在克林黴素作用下，APP 水解途徑是否受到改變。西方墨點法的結果顯示，在 GBM8401 中雖然無法看到 C99 的訊號，但是 C83 的結果可能有隨著克林黴素的作用而減少的趨勢。然而，也在 GBM8401 的細胞培養液中發現 sAPP α 可能有增加的現象。綜合上述結果，本研究初步觀察到克林黴素對於細胞自噬與 APP 水解途徑的影響。關於在克林黴素的處理之下，APP 水解途徑會如何改變以及細胞自噬與 APP 水解途徑改變之間的關係，仍需要進一步的研究證明。

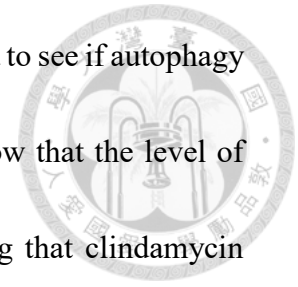
Abstract



Alzheimer's disease is a kind of progressive neurodegenerative diseases to which people paid much attention. One of the features of Alzheimer's disease in histopathology is the formation of senile plaques. Early research has shown that senile plaques are formed from the aggregation of cytotoxic $A\beta$. $A\beta$ is the product of amyloid precursor protein (APP) by β processing, which is cleaved by β -secretase and γ -secretase successively. Many studies have claimed that dozens of factors influence on the synthesis and clearance of $A\beta$, and one of which is autophagy.

Autophagy is a way by which cells are able to degrade some proteins and organelles unnecessary to meet the need and survive under starvation. Recently, scientists found that autophagy is not only switched on when cells are starving, but also when cells are under stimulation or radiation that some organelles are damaged, such as mitochondria, and survival is threatened. By autophagy, cells can prevent themselves from apoptosis. Thus, autophagy is protective. In Alzheimer's disease, some studies show that once autophagy is induced, it leads to decreasing synthesis of $A\beta$ and clearance of $A\beta$ aggregation. However, how autophagy work on the synthesis and clearance of $A\beta$, and even how autophagy work on the alternation of APP processing pathways remains unclear.

In this study, two cell lines, GBM8401 and SH-SY5Y, are used to see if autophagy is regulated under clindamycin treatment. Western blot results show that the level of LC3-II increase obviously in GBM8401 and SH-SY5Y, indicating that clindamycin induces autophagy in two cell lines. Also, GBM8401 is used to see if APP processing pathway is changed under clindamycin treatment. Western blot results show that on one hand, in cell lysate C83 may tend to decrease. On the other hand, however, sAPP α seems to increase in conditioned medium. Above all, this study shows the preliminary effect of clindamycin on autophagy and APP processing pathways. Still, further studies are needed to investigate how clindamycin change APP processing pathway and the relationship between autophagy and APP processing pathways alternation.



英文縮寫表



A β : beta-amyloid

AD: Alzheimer's disease

AICD: APP intracellular domain

Atg: autophagy-related gene

APP: amyloid precursor protein

BACE1: β -site APP-cleaving enzyme 1

BSA: bovine serum albumin

CMA: chaperon-mediated autophagy

CTF: C-terminal fragment

DAPT: *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-(*S*)-phenylglycine *t*-butylester

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

DTT: dithiothreitol

ECL: enhanced chemiluminescence

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FBS: fetal bovine serum

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

LC3B: microtubule-associated protein light chain 3

MEM: Eagle's minimum essential medium

mTOR: mammalian target of rapamycin

MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PBS: phosphate buffered saline

PBST: PBS with 0.1% Tween 20

PDT: population doubling time
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PMSF: phenylmethylsulphonylfluoride
PVDF: polyvinylidene difluoride
rRNA: ribosomal RNA
sAPP: soluble APP
SDS: sodium dodecyl sulfate
SPs: senile plaques
SQSTM1: sequestosome 1
TM: transmembrane
ULK1: unc-51 like autophagy activating kinase 1
VPS34: vacuolar protein sorting 34



目錄



| | |
|--|------|
| 摘要..... | III |
| ABSTRACT..... | IV |
| 英文縮寫表..... | VI |
| 目錄..... | VIII |
| 壹、序論..... | 1 |
| 一、阿茲海默氏症..... | 1 |
| 二、阿茲海默氏症病理研究..... | 1 |
| 三、APP 的細胞運輸和水解途徑..... | 2 |
| 四、細胞自噬..... | 3 |
| 五、細胞自噬的分子機制..... | 4 |
| 六、細胞自噬與 APP 水解途徑..... | 5 |
| 七、克林黴素與前人研究..... | 6 |
| 貳、研究目的..... | 7 |
| 參、實驗方法..... | 8 |
| 肆、實驗結果..... | 12 |
| 一、觀察在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞自噬的改變..... | 12 |
| 二、觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變..... | 13 |
| 伍、討論..... | 15 |
| 一、觀察在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞自噬的改變並比較 兩種細胞株的差異。..... | 15 |
| 二、觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變..... | 16 |
| 陸、圖表說明..... | 18 |
| 參考文獻..... | 28 |



壹、序論

一、阿茲海默氏症

阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, 簡稱 AD)是一類漸進式的神經退化性疾病,可分為早發性遺傳(early-onset familial)、早發性偶發(early-onset sporadic)和晚發性偶發(late-onset sporadic)¹。其中,以晚發性偶發的阿茲海默氏症最為常見且好發於 65 歲以上的老年人²。根據資料統計,2015 年全球約有 4 千 8 百萬人罹患此病症,並且將逐年增加³。

阿茲海默症患者早期會出現記憶力缺失、注意力的控管不足等的症狀。隨著病情逐漸惡化,會導致患者長期記憶缺失、容易迷路、易怒、情緒不穩定、無法正常言語等症狀,最後逐漸喪失身體機能而死亡³⁻⁵。此外,阿茲海默症不但對患者本身造成身心上的傷害,更是其照顧者、家庭和社會上生活和財務的重大負擔之一⁶。因此,若能對於阿茲海默症做有效治療,不僅對患者本身,對家庭和社會負擔都會有莫大的幫助。

由於上述之阿茲海默氏症的影響,近年來已有許多研究投入對於阿茲海默症在不同層面的探討,然而,對於阿茲海默氏症完整的發病機制還不是很清楚,並且也尚未有藥物或其他療法能醫治甚至是減緩阿茲海默症的惡化³。

二、阿茲海默氏症病理研究

關於阿茲海默症在組織病理學上的探討,研究發現在患者大腦的組織切片中,主要可觀察到兩個病徵:神經纏結(neurofibrillary tangles)⁷與老年斑塊(senile plaques)的堆積⁸。其他現象還包括大腦皮質的萎縮,海馬迴的萎縮與腦室的擴大

等現象⁹。研究發現，神經纏結的原因主要與 τ 蛋白（一種 microtubule-associated protein）的變異而過度磷酸化(over-phosphorylation)有關；而老年斑塊則是由於 β -類澱粉粒(β -amyloid, $A\beta$)的堆積造成⁸⁻¹¹，這兩者都會造成神經細胞的凋亡^{56,57}。

三、APP 的細胞運輸和水解途徑

目前阿茲海默氏症在老年斑塊的研究方向多與 $A\beta$ 的生成機制、堆積和訊息傳遞有關。許多文獻指出， $A\beta$ 的生成來自類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)在細胞內的生成與水解有關。APP 是第一型穿膜糖蛋白 (type I integral transmembrane glycoprotein)，在細胞內質網(endoplasmic reticulum, ER)生成，就被送至細胞膜上。在送往細胞膜的過程，nascent APP 會進行 *N*-糖基化(*N*-glycosylation)和 *O*-糖基化(*O*-glycosylation)和磷酸化(phosphorylation)等後轉譯修飾(post-translational modification)¹²。在細胞膜上，少部分(約 10%)的 APP 會留在細胞膜上，反之，大部分的 APP 會再被運送至細胞內的核內體(endosome)和 trans-Golgi network (TGN)¹³。運送回來的 APP 中，一部分會再被運送至細胞膜上，另一部份則會在溶酶體(lysosome)被降解 (圖一)。

APP 的水解主要發生在三個切位- α 、 β 和 γ 切位，其中 α 和 β 切位在膜外而 γ 切位在膜上。APP 會經由兩種不同水解途徑，在細胞內外產生不同的產物。一種是 α 途徑(α processing, 又稱 non-amyloidogenic pathway)，主要發生在細胞膜上。當 APP 被 α -secretase 水解，會產生可溶性的 α APP (soluble APP- α , sAPP α) 釋放至細胞外和留在膜上的一段蛋白質，由 83 個胺基酸組成，稱為 C83 (α C-terminal fragment, CTF α)。C83 進而被 γ -secretase 截切，產生 APP intracellular domain (AICD) 和快速被代謝的 P3 蛋白¹⁴。另一種是 β 途徑(β processing, 又稱 amyloidogenic pathway)，當 APP 被 β -secretase 水解，會產生可溶性的 β APP (soluble APP- β , sAPP β) 和留在膜上的一段蛋白質，由 C99 個胺基酸組成，稱為 C99 (β C-terminal fragment, CTF β)。C99 進而被 γ -secretase 截切，產生 APP intracellular

domain (AICD)和具有細胞毒性的 $A\beta^{15}$ (圖二)。根據 γ -secretase 切位的不同，所產生的 $A\beta$ 也有不同的亞型 $A\beta_{40-42}$ ，其中 $A\beta_{42}$ 較容易堆積而被認為是老年斑塊中的主要成分¹⁷。



四、細胞自噬

細胞分子的代謝主要有兩個方式：對於小分子化合物或蛋白質，細胞會利用將欲分解的小分子化合物或蛋白接上 poly-ubiquitin，再送至蛋白分解酶體 (proteasome) 代謝¹⁷；然而無法藉由蛋白分解酶分解的大分子蛋白，細胞就有另一種機制，就是利用細胞自噬 (autophagy) 來代謝大分子蛋白或胞器等大型物質¹⁸。

細胞自噬可以分類為三種型式：micro-autophagy、macro-autophagy 和 chaperon-mediated autophagy (CMA)¹⁹，其中又以 macro-autophagy 為主要途徑 (以下簡稱細胞自噬，autophagy)。

細胞自噬的作用機轉可以分成四個步驟：當細胞感應到壓力，如大分子蛋白需要代謝或蛋白分解酶受損害而無法正常作用時，細胞自噬會被啟動。首先來自內質網上的膜會形成一種脂雙層碗狀的構造，稱為自噬泡 (phagophore) 或自噬小體 (pre-autophagosomal structure, PAS)，這個步驟稱為成核 (nucleation)。接著自噬泡開始延伸 (elongation)，將細胞質中的成分包入，最後形成雙層膜的自噬體 (autophagosome)。第三步是融合 (fusion)，即自噬體與溶酶體融合 (autophagosome-lysosome fusion)，形成自噬溶酶體 (autophagolysosome)。最後是降解 (degradation)，自噬體與溶酶體融合後，溶酶體中酸性水解酶 (acidic lysosomal hydrolase) 能夠將自噬體中的物質分解並回收²⁰ (圖三)。

細胞自噬最早的發現是與細胞的挨餓 (starvation) 有關²¹。當細胞面臨胺基酸缺乏而無法合成細胞所需要的蛋白，細胞會進行細胞自噬將細胞內次要的蛋白代謝，再生成所需要的蛋白。然而，隨著研究進展，發現細胞自噬不但與細胞挨餓

有關，也有細胞自我保護以及維持胞內蛋白質恆定的作用²²，如當細胞受到外部刺激而造成粒線體受損時，細胞藉由細胞自噬將受損的粒線體分解後再生成可以避免進行細胞凋亡並維持細胞存活²³。因此，許多研究提出，細胞自噬與多種癌細胞的抗藥和對抗輻射有關²⁴⁻²⁶；此外也有文獻指出細胞自噬的調控與神經退化性疾病有關²⁷⁻²⁸。然而，另外有研究指出，過度的誘導細胞自噬會造成細胞凋亡 (apoptosis)²⁹⁻³⁴。因此，關於細胞自噬的機制與如何調控還有待研究探討。

五、細胞自噬的分子機制

細胞自噬的形成與作用，需要許多細胞自噬相關蛋白 (Autophagy-related-gene encoded proteins, Atg proteins) 和其他蛋白質的參與：當細胞要進行細胞自噬時，首先會藉由抑制 mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) 蛋白來啟動細胞自噬的機制³⁰。一開始在自噬泡的形成，需要由 Beclin 1、VPS34 (vacuolar protein sorting 34) 和 p150 組成的 Class III PI3-kinase complex 幫助自噬泡的形成³¹。自噬泡膜的延伸，需要 Atg5-Atg12 conjugation，再與 Atg16L 形成之 Atg12-Atg5-Atg16L complex 的參與³²。而在自噬泡膜延伸的過程中，microtubule-associated protein light chain 3 (LC3B) 會被切割形成 LC3-I，之後再藉 covalent lipidation 將 LC3-I 與 phosphatidylethanolamine (PE) 結合形成 LC3-II 而鑲嵌在自噬泡並自噬體的雙層膜上(包含外膜和內膜)³³ (圖四)。

細胞自噬原先被認為對於包裹在自噬泡和自噬體內的物質是沒有選擇性的，但近年來研究發現，細胞自噬的選擇性與蛋白 sequestosome 1 (SQSTM1，又稱 ubiquitin-binding protein p62，簡稱 p62) 有關³⁵。p62 通常被發現於有接上 poly-ubiquitin 的蛋白質聚集，推測 p62 可能與蛋白質的降解有關。而在 Pankiv *et al.* (2007) 的研究中，p62 直接與 LC3 結合促使細胞自噬降解接上 ubiquitin 的蛋白質，顯示細胞包埋在自噬體內的蛋白質或胞器，是具有選擇性的³⁶。

而在自噬體與溶酶體融合後，溶酶體中的酸性水解酶會降解自噬體內的所有物質，其中 p62 和內膜上的 LC3-II 也一併被降解³⁸；而外膜上的 LC3-II 則會再被去脂化(delipidated)並以 LC3-I 的形式回收^{58,59}。

由於 LC3 processing 在自噬泡的延伸過程中不可或缺，並且 LC3-II 為自噬體的主要組成之一，因此 LC3-II 的量與自噬體的數目有相互關係。Kadowaki *et al.* (2009)提出 LC3-II 和 LC3-I 的比值是一種容易用來觀察細胞自噬的方法³⁷。然而，由於 LC3-I 對不同抗體的親和力差異較 LC3-II 大以及不同細胞株所產生 LC3-I 和 LC3-II 的量也不同，因此有些研究也以 LC3-II 的量對 loading control 做 standardization 的變化觀察細胞自噬的現象^{60,61}。並且，因為 p62 在細胞自噬的過程中會被降解，所以 p62 的量變化也是在研究上常被用於佐證細胞自噬現象的方法³⁸。另外還有 Beclin 1 等細胞自噬相關蛋白的量的變化也被用於觀察細胞自噬的現象。³⁹⁻⁴⁰。

六、細胞自噬與 APP 水解途徑

目前關於細胞自噬與 APP 水解的研究，大多在探討細胞自噬的調控對 APP 在不同水解途徑下產物的影響⁴¹⁻⁴⁴。有文獻指出，當細胞藉由不給予胺基酸或培養液，或者利用 rapamycin 或其他分子藥物處理而誘導細胞自噬發生時，有助於消除細胞內的 A β 和 A β 的堆積⁴⁵⁻⁴⁶。推測 APP 從細胞膜上胞吞回細胞內，在核內體或 TGN 進行 β 水解途徑而產生 A β 時，細胞自噬可能發生，進而促進 A β 的降解。而在 Feng *et al.* (2016)表示，當誘導細胞自噬時，會增加 BACE1 (β -secretase) 的分解，抑制 APP 往 β 途徑⁴²。另外在 APP 的 α 水解途徑中，所產生的可溶性 α -APP 被認為與神經的保護(neuroprotection)有關⁴⁷。Milosch *et al.* (2016)進一步提出可溶性 α -APP 藉由活化 Akt survival signaling pathway 避免細胞進行 apoptosis 而達到神經保護的作用⁴⁸。這些結果顯示，細胞自噬與 APP 水解途徑有調控的關係。

七、克林黴素與前人研究

克林黴素是一種抗生素，通常用於治療由葡萄球菌、溶血性鏈球菌及肺炎球菌等引起的厭氧性感染症⁴⁹。其作用機轉是克林黴素藉由與原核生物的 50S 核醣體次單元(50S ribosome subunit)結合，抑制核醣體易位(ribosomal translocation)而抑制原核生物的蛋白質轉譯而達到抑菌的目的⁵⁰。服用克林黴素可能造成的副作用主要是由於抗生素抗藥性使得腸胃相改變，導致噁心、嘔吐、脹氣、腹瀉等等。

前人發現使用克林黴素，會造成神經膠細胞瘤細胞株 GBM8401 中 LC3-II/LC3-I 值上升以及自噬體的堆積。並進一步實驗發現，克林黴素是藉由抑制溶酶體活性使得細胞自噬作用失調。另一方面，發現克林黴素會造成 APP 往 α 水解的途徑，並藉由活化 ADAM10 (α -secretase)，使得可溶性 α APP 上升。綜合以上，前人研究提出克林黴素的處理不僅干擾細胞自噬，也影響 APP 的水解途徑⁶⁶。而克林黴素處理下所造成的細胞自噬作用失調與可溶性 α APP 上升之間是否互相有關聯性或者只是兩個獨立的事件仍屬未知。

貳、研究目的

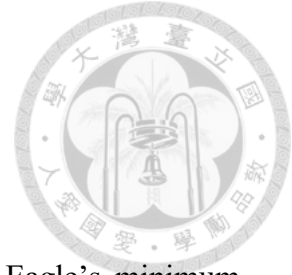
過去已經有許多研究關於細胞自噬與 APP 水解之間的關聯，但大多在於調控細胞自噬對 APP 在不同水解途徑下產物的影響。許多研究顯示當誘發細胞自噬時，會造成細胞內 A β 量減少，甚至抑制 A β 的堆積。然而較少文獻探討細胞自噬對於 APP 水解途徑的影響。

基於前人的研究，本研究感興趣於細胞自噬的調控與 APP 水解途徑之間的關係，並且更進一步在分子機制上探討他們的關聯性。前人以神經膠細胞瘤細胞株 GBM8401 做研究，但因為 APP 主要表現在神經細胞，因此在本實驗系統中，使用了兩種細胞株-神經膠細胞瘤細胞株 GBM8401 以及人類神經母細胞瘤細胞株 SH-SY5Y 作為實驗對象。首先，要觀察在克林黴素處理下，GBM8401 與 SH-SY5Y 細胞自噬的改變。再者，也要觀察是否在這兩種細胞株中 APP 有水解途徑的改變。藉此結果，本研究希望下一步能夠了解細胞自噬在 APP 水解途徑中的角色。

Specific Aims

1. 觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中細胞自噬的改變，並比較兩種細胞株的差異。
2. 觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變。

參、實驗方法



1. 細胞培養

人類神經母細胞瘤細胞株(SH-SY5Y cell line)培養液為 Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco®) 與 Ham's F12 nutrients (Gibco®)以 1:1 混合，再加入 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries)、1 mM sodium pyruvate (Gibco®)及三合一抗生素 (100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg amphotericin B, HyClone, Thermo Scientific)，於 5%二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養。

人類膠質母細胞瘤細胞株(GBM8401 cell line)培養液為 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®)，再加入 10% FBS 及三合一抗生素，於 5%二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養。

2. MTT 試驗

細胞在除去培養液之後，以 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM K₂HPO₄)潤洗兩次，再用 trypsin-EDTA (Gibco®)作用 3 分鐘 (GBM8401 用濃度 0.05%；SH-SY5Y 用濃度 0.05%)。之後以培養液將細胞沖離下來，移至 10 mL 離心管中，再以 0.6 krcf 離心 10 分鐘後去除上清液。以 20mL 培養液稀釋細胞，將其中的 200 µL 的細胞懸浮液種入 96-well plate 的 well 中(每個 well 約 1-2*10³ 個細胞)，並於 5%二氧化碳、37 °C 恆溫培養箱中培養 24 hr。待細胞貼附之後，除去培養液並以 PBS 潤洗，加入 200 µL 含有不同濃度(0, 10, 20, 50, 100 µg/mL)克林黴素(10 µg 溶於 1 mL ddH₂O)的培養液，並於 5%二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養 24 hr。之後，除去培養液，並加入 200 µL 培養液，於 5%二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養，使細胞生長 2 個 population doubling time (PDT)(GBM8401:2 天；SH-SY5Y:4 天)。接著除去培養液，並於每個 well 中

加入 200 μ L 培養液和 50 μ L MTT solution (濃度 0.5 mg/mL) ，於 5% 二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養 4 小時。之後除去培養液和 MTT solution 並加入 200 μ L DMSO，搖晃 5 分鐘後，測量在波長 560 nm 的吸光值。



3. 克林黴素處理

將 GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞株(10 cm dish, 細胞密度 60%-70%)培養在含有克林黴素(分子量：461.44，#C5269，Sigma-Aldrich) (GBM8401：濃度 0, 2, 5, 10 μ g/mL；SH-SY5Y：濃度 0, 10, 20, 50 μ g/mL)的培養液中，放置於 5% 二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時後收取細胞。

4. 細胞株飢餓處理

將 GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞株在未加 FBS 的培養液中，並放置於 5% 二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養 6 小時後收取細胞。

5. 抽取蛋白

細胞在除去培養液之後，以 PBS 潤洗兩次，再用 trypsin-EDTA 作用 3 分鐘 (GBM8401 用濃度 0.05%；SH-SY5Y 用濃度 0.05%)。之後以培養液將細胞沖離下來，移至 10 mL tube 中，再以 0.6k rcf 離心 10 分鐘後去除上清液。加入含有 protease inhibitor mixture (0.1 μ g/mL chymostatin, 0.5 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin A, 2.5 μ g/mL antipain HCl, 1 mM benzamide) 和 1 mM PMSF 及 1 mM DTT 的 TNET buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 1% Triton X-100, pH 7.5)將細胞打散並移至 Eppendorf tube。放置冰上靜置 20 分鐘，之後再以 10 k rcf 於 4°C 下離心 10 分鐘後，抽取上清液並儲存於 -20°C。

6. 蛋白質定量

使用 Bradford Protein Assay (Bio-Rad) 呈色反應做蛋白質定量。利用 5 倍稀釋的 Bradford Protein Assay Dye，加入不同濃度的 BSA (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 做 standard curve，測在波長 595nm 下的吸光值，並以內插法算出蛋白質 sample 濃度。

7. SDS-PAGE 與西方墨點法

依據目標蛋白分子量不同而製作 6-16% 的 polyacrylamide gel。將蛋白質 sample 與 sample buffer (10% SDS, 25% 2-mercaptoethanol, 50% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 0.3125M Tris-HCl, pH 6.8) 混合並煮沸 5 分鐘後，放置冰上冷卻 5 分鐘。之後將其加入 polyacrylamide gel 進行 SDS-PAGE 電泳。之後 transfer 至 PVDF membrane (Pall Corporation) 上。待 transfer 結束後，將 membrane 浸泡在含有 5% 脫脂牛奶的 PBST 中進行 blocking，在室溫下搖晃 1 小時。以 PBST 潤洗 5 分鐘共 3 次。

(1) 觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中細胞自噬的改變，並比較兩種細胞株的差異。

抗體使用如下：以 PBST 稀釋 2000 倍的 anti-LC3B 一級抗體 (#GTX127375, Genetex)、稀釋 3000 倍的 anti-SQSTM1 (#GTX629890, Genetex) 一級抗體和稀釋 10000 倍的 anti-GAPDH (#MAB374, Millipore) 一級抗體於室溫下震盪反應 1 小時或 4°C overnight。用 PBST 潤洗 5 分鐘共 3 次。再用以 PBST 稀釋 5000 倍的 HRP-conjugated goat anti-rabbit (#sc2030, Santa Cruz Biotechnology) 和稀釋 5000 或 10000 倍 goat anti-mouse (#sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) 二級抗體於室溫下震盪反應 1 小時。用 PBST 潤洗 5 分鐘共 3 次。最後將此 PVDF membrane 以

ECL (VisGlow Chemiluminescent substrate, Visual Protein) 試劑沖潤均勻後用 X 光片偵測冷光訊號。

(2) 觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變。

抗體使用如下：以 PBST 稀釋 5000 倍的 anti-APP C-terminus (#A8717, Sigma-Aldrich)、anti-APP N-terminus (22c11) (#MAB374, Millipore) 以及 anti-A β (6E10) 一級抗體(#SIG-39320, Covance)、稀釋 10000 倍的 anti-GAPDH 一級抗體於室溫下震盪反應 1 小時或 4°C overnight。用 PBST 潤洗 5 分鐘共 3 次。再用以 PBST 稀釋 10000 倍的 HRP-conjugated anti-rabbit 或 anti-mouse 二級抗體於室溫下震盪反應 1 小時。用 PBST 潤洗 5 分鐘共 3 次。最後將此 PVDF membrane 以 ECL (VisGlow Chemiluminescent substrate, Visual Protein) 試劑沖潤均勻後用 X 光片偵測冷光訊號。

8. 數據分析

利用西方墨點法所得的實驗數據使用 ImageJ 軟體 (National Institutes of Health, USA) 對 antibody-specific bands 的訊號強度做定量分析。不同數據再以 Student's *t* test 做統計分析。

9. DAPT 處理

將 GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞株(10 cm dish, 細胞密度 60%-70%)培養在加入 200nM DAPT 的培養液中，並放置於 5%二氧化碳、37°C 恆溫培養箱中培養 4 小時後收取細胞。

肆、實驗結果



一、觀察在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞自噬的改變

1. MTT 試驗找出克林黴素的實驗濃度

克林黴素為一種抗生素，有對原核生物抑菌的效果。在將克林黴素用於對細胞株的研究之前，首先要確認克林黴素對細胞株的毒殺效果與合適的實驗濃度。本實驗所用來分析細胞存活情形的方法為 MTT 試驗，目的在於找到對兩種細胞株不會有毒殺效果的適當添加濃度。MTT 試驗的原理為：黃色的 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試劑會在活細胞粒線體中發生化學反應：在 mitochondrial reductases 的作用下並藉由將電子傳遞給 MTT，使 MTT 結構中的 tetrazolium 開環，形成藍紫色 formazan 結晶 (圖五-A)。在死細胞中，因為 mitochondrial reductase 的降解，MTT 無法被還原而仍呈黃色。因此，formazan 結晶的生成量可以反映活細胞的數目，而可以藉由測量 formazan 在 560 nm 的吸光值得知細胞存活的情形。

GBM8401 的結果顯示，在克林黴素濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ 的處理下，OD₅₆₀ 值有下降的現象 (圖五-B)，代表 10 $\mu\text{g/ml}$ (含)以上的克林黴素對 GBM8401 就已經具有毒殺效果。而 SH-SY5Y 的結果則是，在克林黴素一直到 100 $\mu\text{g/ml}$ ，OD₅₆₀ 值才開始降低 (圖五-C)。因此建立了後續實驗的添加濃度：

GBM8401 為 控制組、2 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ ；

SH-SY5Y 為 控制組、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

控制組為加藥時不加入克林黴素，只更換培養液的組別。

顧慮到 SH-SY5Y 屬於不是完全貼附型的細胞株，以克林黴素處理 24 小時後更換培養液可能導致部分細胞被移除而影響數值。因此實驗另外做了一組控制

組(不加克林黴素)，差別在於 24 小時之後不更換培養液，要觀察是否會影響細胞存活數目的分析。結果顯示有無更換培養液，數值上沒有明顯的差異，因此在進行 MTT 試驗時更換培養液得到的數值可以信賴。(圖五-C)。



2. 細胞自噬

為了要觀察克林黴素是否會改變細胞自噬，將不同濃度的克林黴素加入兩種細胞株的培養液中作用 24 小時，以西方墨點法觀察並分析細胞自噬的情形。

在 GBM8401 細胞株中，西方墨點法的結果顯示，當加入克林黴素時，細胞自噬的標的蛋白 LC3-II 的訊號相較於控制組有顯著的增加。以 LC3-II 對 GAPDH 做定量分析，發現在 2、5、10 $\mu\text{g/ml}$ 的克林黴素處理下，都有大約 2.5 倍的明顯的上升 (圖六-A、B)。而在 SH-SY5Y 細胞株中，也發現與 GBM8401 細胞株同樣的現象。在加入克林黴素之後，LC3-II 有增加的現象，而以 LC3-II 對 GAPDH 做定量分析，得到在 10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ 的克林黴素處理下，LC3-II 相較於控制組也都有明顯的上升 (圖六-E、F)。

另外，也觀察了 GBM8401 細胞株中 p62 的表現量，發現在加入克林黴素後，p62 有上升的現象 (圖六-C、D)。

二、觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變

1. APP 水解途徑

由於 C99 和 C83 分別為 APP 經由 β -secretase 和 α -secretase 水解之後的產物，C99/C83 的比值可以表示 APP 水解途徑的改變。C99/C83 的比值上升代表 APP 傾向往 β 水解途徑進行。反之，C99/C83 的比值下降代表 APP 傾向往 α 水解途徑進行。為了避免 C99 和 C83 繼續被 γ -secretase，本實驗使用 DAPT 抑制 γ -secretase 的活性。因此將不同濃度的克林黴素加入 GBM8401 和 SH-SY5Y 的培

養液中作用 24 小時，並將兩種細胞株在各個濃度的克林黴素分成兩組，在其中的一組加入了 200nM DAPT 作用 4 小時，另一組則以未加入 DAPT 為控制組。藉由西方墨點法觀察並分析並觀察 C99/C83 值。



西方墨點法分析 GBM8401 細胞株的結果顯示，在有加入 DAPT 的組別中，可以看到在大小 17kDa 以下有訊號，而對照之下沒有加入 DAPT 的組別沒有此訊號。並且與正控制組(positive controls)(由實驗室成員周庭宇提供)比對，位置很相似，因此判定該訊號很有可能是 C83 的訊號 (圖七-A)。然而，因為無法觀察到有加入 DAPT 組別的 C99 訊號，只能觀察不同濃度克林黴素之下 C83 的變化量。將 C83 對 APP 做定量分析，發現可能有下降的趨勢 (圖七-B)。

為了要觀察 APP 水解途徑的改變，進一步將加入克林黴素(有/無 DAPT)的細胞培養液收集，並以 anti-A β 觀察 sAPP α 的表現量變化 (圖七-C)，以 BSA 作為定量標準，發現在加入克林黴素與 DAPT 處理的細胞培養液中，sAPP α 有增加的現象 (圖七-D)。

另一方面，在 SH-SY5Y 的結果中，由於無法觀察到 C99、C83 的訊號，並且 APP 的訊號也很微弱，因此無法判定克林黴素對 APP 水解途徑改變的影響 (圖七-E)。

綜合以上，本實驗結果發現：(1) 在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y LC3-II 的量都有增加的現象，表示都有發生細胞自噬，並且在 GBM8401 現象較為明顯。(2) 在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 都尚未能判定對 APP 水解途徑改變的影響。在 GBM8401 中，C83/APP 減少 sAPP α 卻增加。



伍、討論

一、觀察在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞自噬的改變並比較兩種細胞株的差異。

本實驗以 LC3-II 對 GAPDH 定量來觀察細胞自噬，考量如下：細胞自噬的情形反映在自噬泡和自噬體的形成，而自噬泡和自噬體形成的量越多，其膜上所鑲嵌的 LC3-II 越多。換句話說，LC3-II 的量與自噬泡和自噬體的量呈正相關性，能反映細胞自噬的情形。並且 LC3-I 對不同抗體的親和力差異較 LC3-II 大以及不同細胞株所產生 LC3-I 和 LC3-II 的量也不同，因此若以 LC3-II/LC3-I 值為參考，則會造成定量上出現誤差。此外，在 Klinosky *et al.* (2016)(Guidelines for monitoring autophagy)提到不同種類的細胞株，會因為細胞本身細胞自噬流 (autophagy flux)和溶酶體分解的速率不同，導致 LC3-I 和 LC3-II 的量不同甚至 LC3-I 和 LC3-II 的圖樣(pattern)也不一樣。並且給予細胞不同的刺激(例如：分子藥物或挨餓)或是刺激處理的時間不同，也會造成不同量的 LC3-I 和 LC3-II⁶³。

除了以 LC3-II 定量觀察細胞株細胞自噬的情形，實驗也觀察了 p62 的變化量，預期 p62 的表現量變化應該要隨著細胞自噬的發生而降低。結果出乎的預期，實驗結果顯示，在 GBM8401 細胞株中，當加入克林黴素時，LC3-II 的表現量增加時，p62 的表現量也隨之提高，然而，無法看出一定的趨勢。也發現在控制組(未加入克林黴素)中 p62 的表現量最低。推測可能是 (一) 由於進行細胞自噬的過程，p62 會被生成而與 LC3-II 有交互作用，之後又會因為自噬體與溶酶體融合而被降解，因此 p62 的表現量在整個細胞自噬的過程中，是隨著不同的階段而有增減。推測 p62 的表現量可能與克林黴素處理的時間和收取細胞的時間有關，代表收取細胞的時間點可能在細胞自噬的不同階段。在 Sahani *et al.* (2014)的研究中顯示，當細胞株的細胞培養液除去血清時，p62 的表現量在 4 小時之後有回復的趨勢。對此 Sahani *et al.*推論，細胞在長時間挨餓的環境下，因為細胞自噬已分

解一些物質而又足夠的胺基酸，p62 能補償性的增加表現量⁶²。這樣的現象加強了 p62 表現量會受不同實驗時間影響的推論。

因此，克林黴素處理時間和收取細胞在細胞自噬的不同階段會影響 LC3-II 和 p62 的量。對此，之後可以做 time-course 的實驗找到最合適的實驗條件。

(二) 在前人的研究中顯示，當 GBM8401 細胞株以克林黴素處理時，其結果與加入 Bafilomycin A1 相似。前人推論克林黴素可能作用在干擾自噬體和溶酶體的融合而造成 LC3-II 的堆積。雖然這樣的理論似乎可以解釋 p62 可能因此堆積而有增加的現象，但仍然需要進一步的實驗確定克林黴素的作用標的。

二、觀察克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變

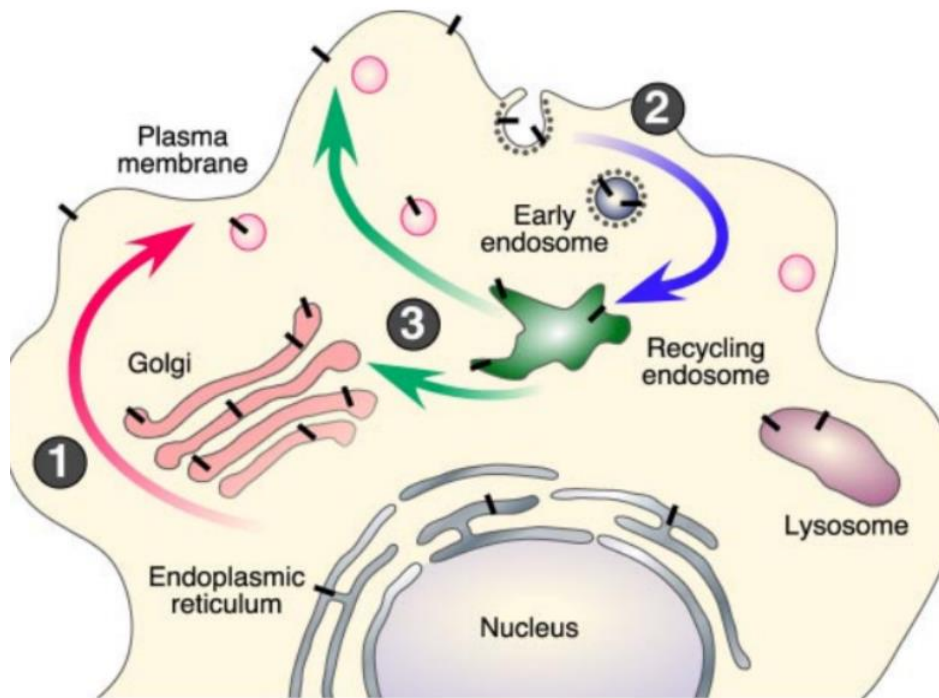
在實驗結果中觀察到當 GBM8401 以克林黴素作用，並以 DAPT 抑制 γ -secretase 的作用，發現 C83/APP 有下降的趨勢，推測此結果函示 APP 往 α 水解途徑(non-amyloidogenic pathway)的比例減少。然而，在以細胞培養液觀察 sAPP α 的變化量時，卻得到上升的現象。對於此結果，的推論如下：(一) 以克林黴素處理 GBM8401，可能造成細胞內 APP 總量增加，但同時也使得 APP 的水解往 α 水解途徑的比例減少。因此，雖然 sAPP α 增加，但 C83/APP 的比值卻減少。在往後的實驗，可以增加用暫時過量表現 APP 的 GBM8401 來觀察 C99/C83 並且可以觀察 ADAM10 (α -secretase) 或 BACE (β -secretase) 的表現量或活性得知 APP 水解途徑的改變。(二) 西方墨點法的結果中的 loading control (GAPDH 和 BSA) 訊號條帶太粗以至於可能在定量上有誤差。(三) 由於 sAPP α 的實驗數據的僅有一次，不足以用統計代表克林黴素作用下 APP 水解途徑的趨勢。

而在 SH-SY5Y 的實驗結果中，無法觀察到 C99 和 C83 的訊號，甚至 APP 的訊號也非常微弱。推測應該是因為 SH-SY5Y 內生的(endogeneous)APP 太少而

無法被偵測。之後可以利用過量表現 APP 的 SH-SY5Y 細胞株(transfected/ stable clone)來觀察在克林黴素處理之下 APP 水解的情形。

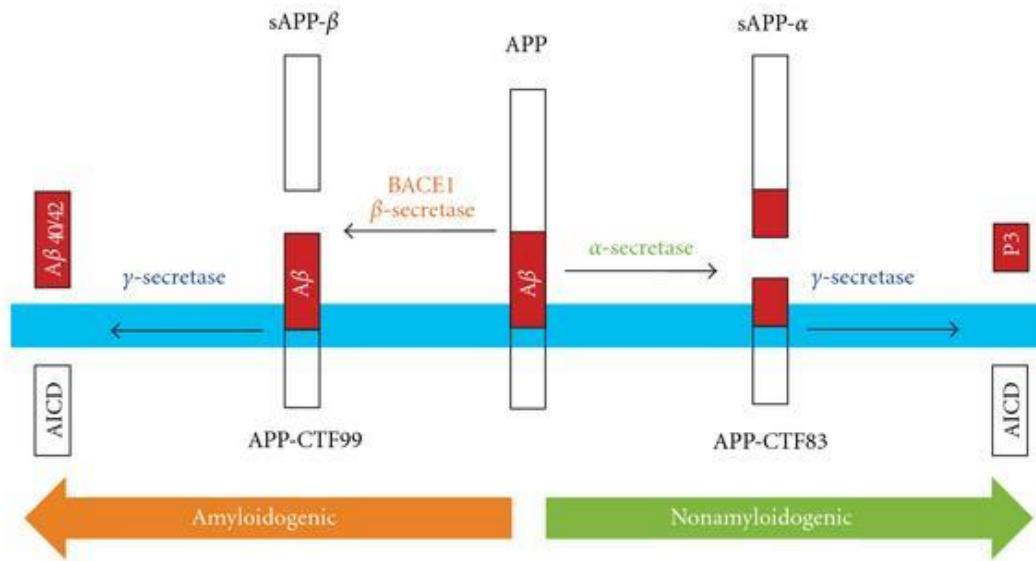


陸、圖表說明



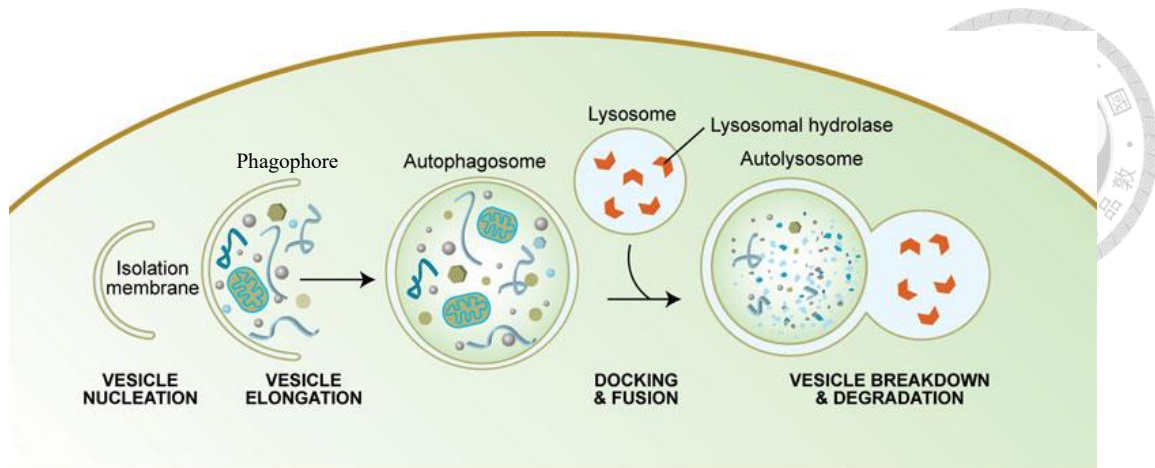
圖一、APP Trafficking 示意圖⁵¹

APP 在 ER 生成之後，會被運送到細胞膜上(1)。少部分的 APP 會留在細胞膜上，而大部分的 APP 會經由胞吞再被運送回細胞內(2)。運送回來的 APP 中，一部份會再被回細胞膜上(3)，另一部份則藉由溶酶體降解。



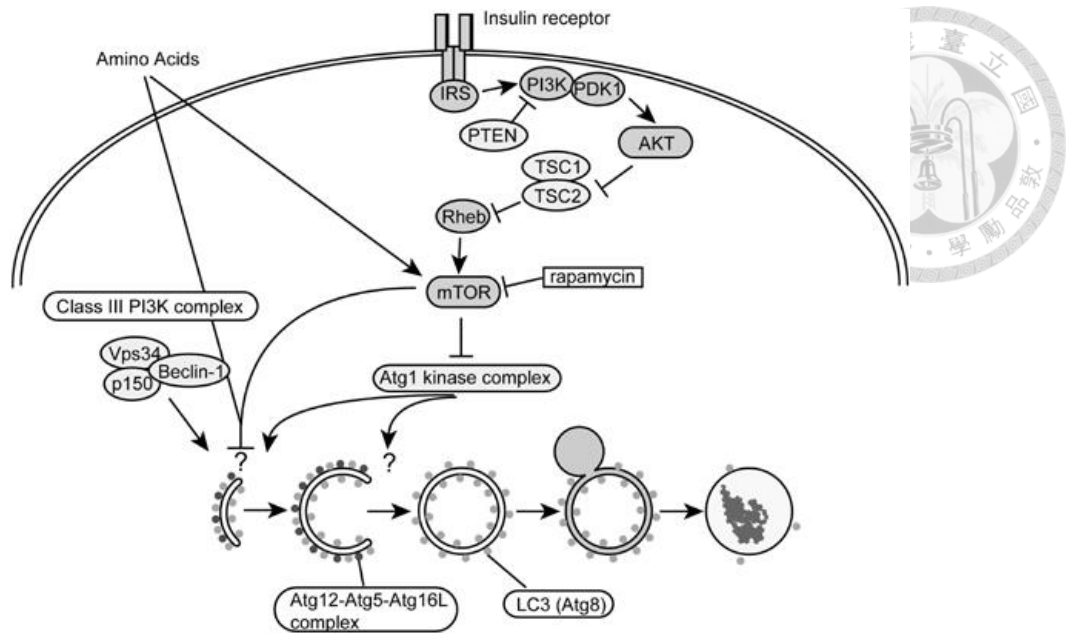
圖二、APP processing 示意圖⁵⁵

APP processing 有主要兩種，一種是 non-amyloidogenic pathway (α processing) (圖右)，APP 經由 α -secretase 水解，會產生 sAPP α 釋放至細胞外和一段留在膜上的 C83，C83 會再被 γ -secretase 水解，產生 APP intracellular domain (AICD) 和 P3 蛋白；另一種則是 amyloidogenic pathway (β processing) (圖左)，APP 經由 β -secretase 水解，會產生 sAPP β 和一段留在膜上的 C99，C99 會再被 γ -secretase 水解，產生 AICD 和 A β 。



圖三、細胞自噬形成與作用示意圖⁵²

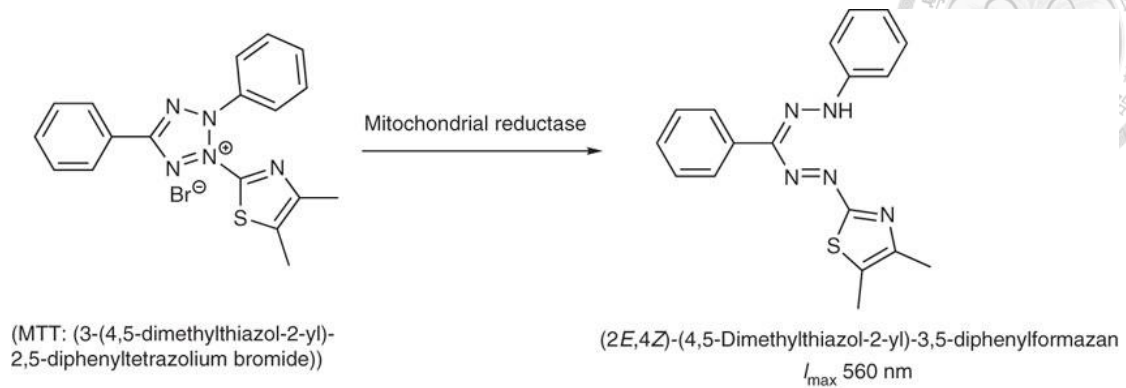
細胞自噬的作用過程分成四個步驟：首先碗狀脂雙層的結構在 ER 形成，稱為 phagophore (nucleation)。接著 phagophore 的膜延伸，同時將欲分解的物質包在其中，逐漸形成 autophagosome (elongation)。之後，autophagosome 和 lysosome 融合形成 autolysosome (fusion)。最後，lysosome 中的酸性蛋白酶作用，將 autophagolysosome 中的物質分解 (degradation)。



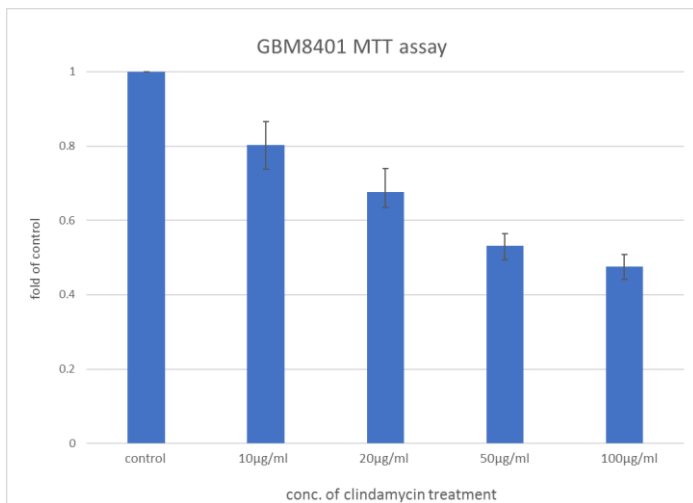
圖四、細胞自噬分子機制示意圖⁵³

細胞自噬的作用需要許多蛋白質的參與。首先藉由抑制 mTOR，開始細胞自噬的啟動。在 phagophore 形成之前，需要 ULK-1-FIP200-Atg13 complex 為基礎形成雙層膜的構造(圖中未顯示)。再者，phagophore 的形成需要由 VPS34、p150 和 Beclin-1 所組成的 Class III PI3K complex 的作用。而當 phagophore 延伸時，會有 LC3-I 與 Phosphatidylethanolamine (PE) 共價形成 LC3-II 並鑲嵌於 phagophore 和 autophagosome 的外膜和內膜。

A

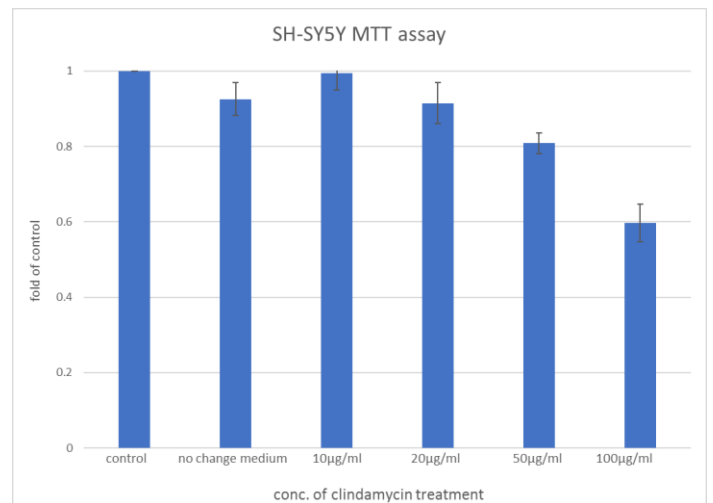


B



(N=3)

C



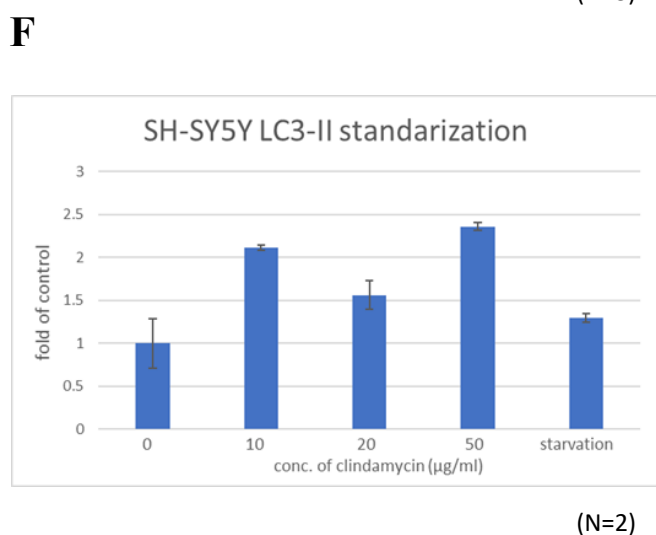
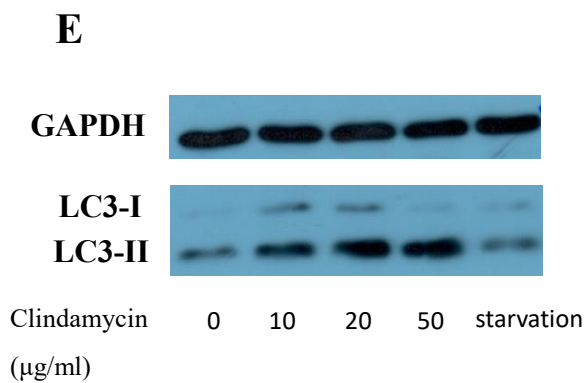
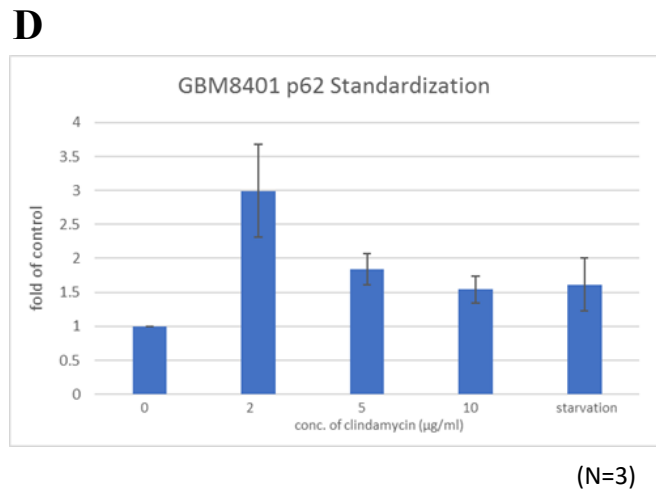
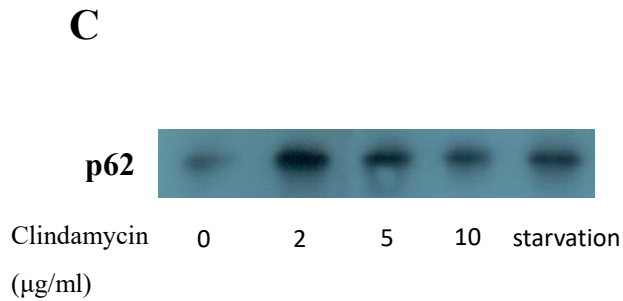
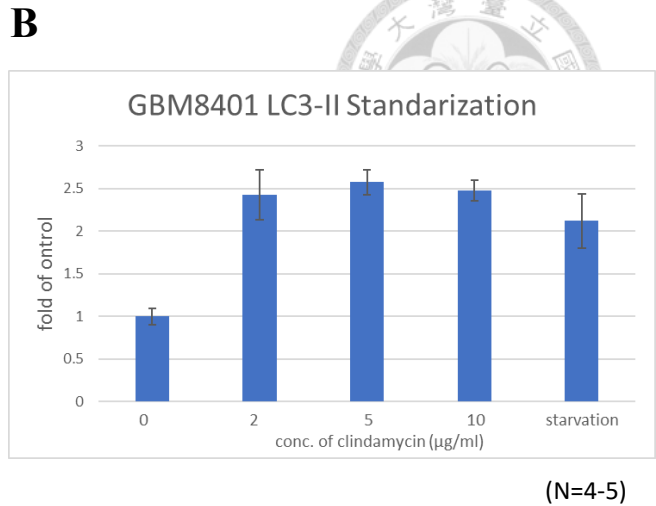
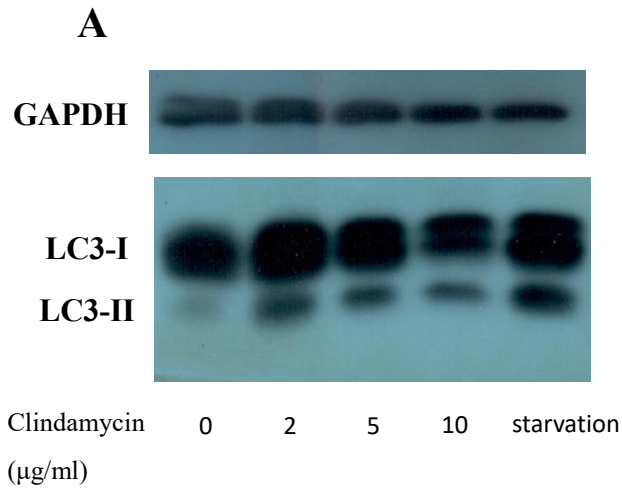
(N=2)

圖五、MTT assay 原理⁵⁴ 與利用 MTT assay 找出克林黴素的實驗濃度

A. MTT assay 為測量細胞存活率常使用的方法。原本為黃色的 MTT 試劑能夠進入細胞並在活細胞的粒線體中藉由 mitochondrial reductase 的還原而打開 tetrazolium ring，形成 formazan 藍紫色結晶。然而，若在死細胞內，MTT 試劑無法被還原，仍然呈現黃色。B. MTT assay 分析克林黴素對 GBM8401 的毒殺效果。結果顯示以 10 μ g/ml 克林黴素處理的組別，OD₅₆₀ 就已下降，表示在 10 μ g/ml 克林黴素對 GBM8401 已具有毒殺效果。因此 GBM8401 實驗濃度選用控制組(不加藥)、2 μ g/ml、5 μ g/ml 和 10 μ g/ml 克林黴素。C. MTT assay 分析克林黴素對 SH-

SY5Y 的毒殺效果。結果顯示以 100 $\mu\text{g/ml}$ 克林黴素處理的組別， OD_{560} 才有明顯下降。另外，加藥過程中有否更換培養液不影響實驗結果。因此 SH-SY5Y 實驗濃度選用控制組(不加克林黴素)、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 克林黴素。Error bar 代表 standard error。





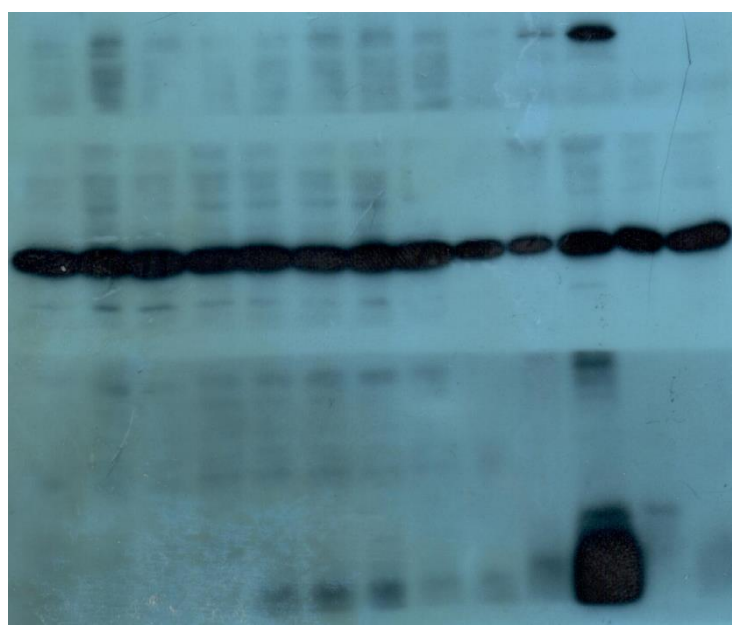
圖六、觀察在克林黴素處理之下，GBM8401 和 SH-SY5Y 細胞自噬的改變

A-D. 將 GBM8401 以不同濃度的克林黴素處理 24 小時後收取細胞，以 Western Blot 觀察不同濃度下細胞內 LC3-II 的量(A)，LC3-II 對 GAPDH 作 standardization

的定量結果(B)以及 p62 的量(C)，p62 對 GAPDH 作 standardization 的定量結果(D)。E-F. 將 SH-SY5Y 以不同濃度的克林黴素處理 24 小時後收取細胞，以 Western Blot 觀察不同濃度下細胞內 LC3-II 的量(E)，LC3-II 對 GAPDH 作 standardization 的定量結果(F)。實驗結果使用 ImageJ 進行定量。Error bar 代表 standard error。



A



full length APP

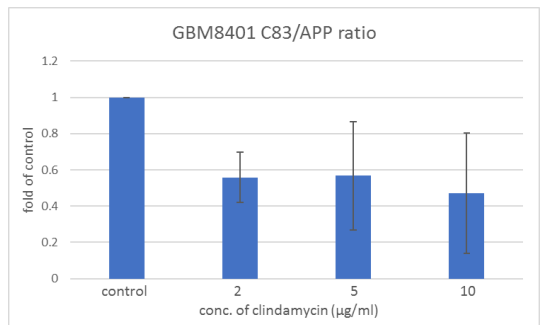
GAPDH

C99

C83

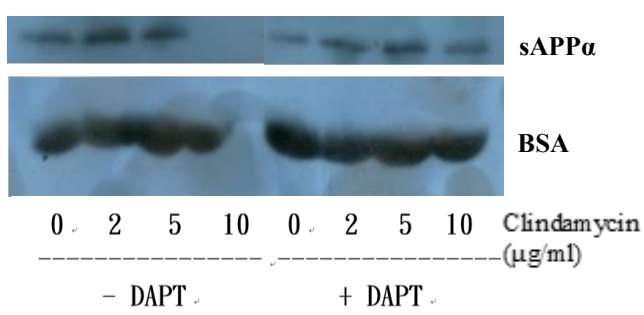
| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|---|---|----|--------|---|---|----|-------------------|-----|-----|-----|
| Clindamycin ($\mu\text{g/ml}$) | 0 | 2 | 5 | 10 | 0 | 2 | 5 | 10 | (1) | (2) | (3) | (4) |
| | - DAPT | | | | + DAPT | | | | Positive controls | | | |

B



(N=2)

C

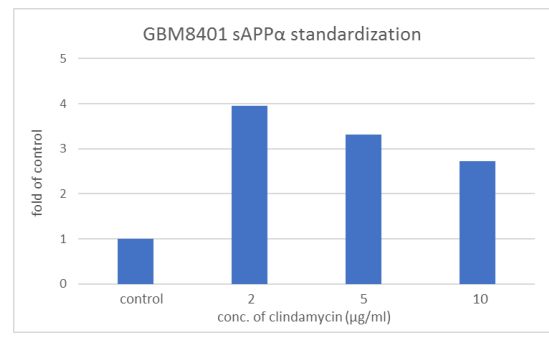


sAPP α

BSA

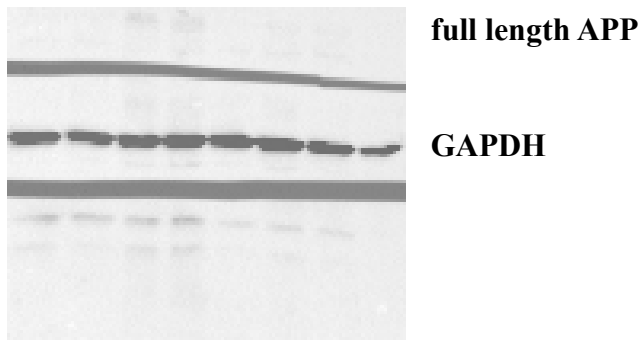
| | | | | | | | | | |
|--|--------|---|---|----|--------|---|---|----|-------------------------------------|
| | 0 | 2 | 5 | 10 | 0 | 2 | 5 | 10 | Clindamycin ($\mu\text{g/ml}$) |
| | - DAPT | | | | + DAPT | | | | |

D



(N=1)

E



| | | | | | | | | |
|--------|----|----|----|--------|----|----|----|-------------|
| 0 | 10 | 20 | 50 | 0 | 10 | 20 | 50 | Clindamycin |
| + DAPT | | | | - DAPT | | | | (µg/ml) |



圖七、觀察克林黴素處理下，GBM8401 和 SH-SY5Y 中 APP 水解途徑的改變

A-D. 將 GBM8401 細胞株以克林黴素處理 24 小時(其中一組加入 200nM DAPT 作用 4 小時以抑制 γ -secretase 的活性)之後收取細胞及其細胞培養液。以 Western Blot 觀察不同濃度下細胞內的 C99、C83 和 APP 變化量。positive controls : (1) SH-SY5Y 細胞株穩定過量表現 wild-type APP695 (2) Cos7 細胞株穩定過量表現 wild-type APP695 (3) Cos7 細胞株穩定過量表現 wild-type C99 (4) Cos7 細胞株穩定過量表現 wild-type C83(A) 及其定量(B) sAPP α 變化量(C) 及其對 BSA 的定量(D)。**E.** SH-SY5Y 的結果。Error bar 代表 standard error。

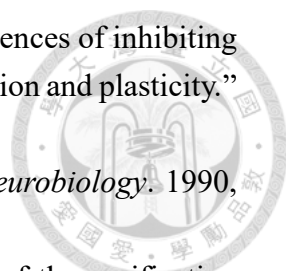
參考文獻

1. J. Williamson and S. LaRusse. "Genetics and genetic counseling: recommendations for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and Creutzfeldt-Jakob disease." *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2004, 4(5), 351-357.
2. S. Brookmeyer. "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset." *American Journal of Public Health*. 1998, 88(9), 1337-1342.
3. Dementia. "Fact sheet N°362." *World Health Organization*. 2015.
4. A. Burns and S. Iliffe. "Alzheimer's disease." *British Medical Journal*, 2009, 338.
5. G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price and E. M. Stadlan. "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease." *Neurology*. 1984, 939-944.
6. J. P. Michel, D. Zekry, R. Mulligan, E. Giacobini and G. Gold. "Economic considerations of Alzheimer's disease and related disorders." *Aging Clinical and Experimental Research*. 2001, 13(3), 255-260.
7. W. Henneman, J. D. Sluimer, J. Barnes, W. M. Flier, I. C. Sluimer, N. C. Fox, P. Scheltens, H. Vrenken and F. Barkhof. "Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease." *Neurology*. 2009, 72(11), 999-1007.
8. M. Goedert. "Tau protein and neurodegeneration." *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2004, 15, 45-49.
9. E. Storey and R. Cappai. "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A β peptide." *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1999, 25, 81-97.
10. C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther. "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985, 82(12), 4245-4249.
11. L. C. Walker, C. C. Ibegbu, C. W. Todd, H. L. Robinson, M. Jucker, H. LeVine III and S. Gandy. "Emerging prospects for the disease-modifying treatment of Alzheimer's disease." *Biochemical Pharmacology*. 2005, 69 (7), 1001-1008.
12. J. Walter and C. Haass. "Posttranslational modifications of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease." *Humana Press*. 2000, 149-68.
13. C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran and S. Sisodia. "Trafficking and proteolytic processing of APP." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, 2(5).
14. E. Storey and R. Cappai. "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A β 44 peptide." *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1999, 25 (2), 81-97.

15. R. J. O'Brien and P. C. Wong. "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." *Annual Review of Neuroscience*. 2011, 34(1), 185-204.
16. M. Murphy and H. LeVine III. "Alzheimer's disease and the β -Amyloid peptide." *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, 19(1), 311.
17. S. H. Lecker, A. L. Goldberg and W. E. Mitch. "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006, 17, 1807-1819.
18. D. Glick, S. Barth and K. F. Macleod. "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." *The Journal of Pathology*. 2010, 221(1), 3-12.
19. N. Mizushima. "Autophagy: process and function." *Genes and Development*. 2007, 21(22), 2861-73.
20. C. He and D. J. Klionsky. "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." *Annual Review of Genetics*. 2009, 43, 67-93.
21. G. E. Mortimore and A. R. Pösö. "Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply." *Annual Review of Nutrition*. 1987, 7, 539-564.
22. K. Tanaka and N. Matsuda. "Proteostasis and neurodegeneration: The roles of proteasomal degradation and autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014, 1843(1), 197-204.
23. F. P. López, M. K. Lotz, F. J. Blanco and B. Caramés. "Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes." *Arthritis & Rheumatology*. 2015, 67(4), 966-76.
24. G. Yuan, S. Yan, H. Xue, P. Zhang, J. Sun and G. Li. "Cucurbitacin I induces protective autophagy in glioblastoma in vitro and in vivo." *The Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289, 10607-10619.
25. K. W. Kim, R. W. Mutter, C. Cao, J. M. Albert, M. Freeman, D. E. Hallahan and B. Lu. "Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling." *The Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281, 36883-36890.
26. K. Degenhardt, R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gélinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin and E. White. "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." *Cancer Cell*, 2006, 10, 51-64.
27. R. A. Nixon. "The role of autophagy in neurodegenerative disease." *Nature Medicine*. 2013, 19, 983-997.
28. F. M. Menzies, A. Fleming and D. C. Rubinsztein. "Compromised autophagy and neurodegenerative diseases." *Nature Reviews Neuroscience*. 2015, 16(6), 345-57.
29. M. C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, G. Kroemer. "Self-eating and self-killing:

- crosstalk between autophagy and apoptosis.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007, 8(9), 741-52.
30. P. Codogno and A. J. Meijer. “Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death.” *Cell Death and Differentiation*. 2005, 12, 1509-1518.
31. S. A. Tooze and T. Yoshimori. “The origin of the autophagosomal membrane.” *Nature Cell Biology*, 2010, 12(9), 831-5.
32. J. Romanov, M. Walczak, I. Ibricic, S. Schüchner, E. Ogris, C. Kraft and S. Martens. “Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation.” *The EMBO Journal*. 2012, 31(22), 4304-4317.
33. I. Tanida and T. Ueno and E. Kominami. “LC3 and Autophagy.” *Methods in Molecular Biology*. 2008, 445, 77-88.
34. J. J. Lum, D. E. Bauer, M. Kong, M. H. Harris, C. Li, T. Lindsten, C. Thompson. “Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis.” *Cell*. 2005, 120, 237-248.
35. G. Bjørkøy, T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark and T. Johansen. “p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death.” *The Journal of Cell Biology*. 2005, 171(4), 603–614.
36. S. Pankiv, T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Øvervatn, G. Bjørkøy and T. Johansen. “p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy.” *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282, 24131-24145.
37. M. Kadowaki and M. R. Karim. “Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy.” *Methods in Enzymology*. 2009, 452, 199-213.
38. G. Bjørkøy, T. Lamark, S. Pankiv, A. Øvervatn, A. Brech and T. Johansen. “Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1.” *Methods in Enzymology*. 2009, 452, 181-97.
39. H. Pugsley, S. Friend, R. Kong, S. Vaidyanathan and P. Morrissey. “Measuring autophagic flux by assessing LC3, p62 and LAMP1 co-localization using imaging flow cytometry.” *The Journal of Immunology*. 2015, 194(1).
40. R. C. Russell, Y. Tian, H. Yuan, H. W. Park, Y. Y. Chang, J. Kim, H. Kim, T. P. Neufeld, A. Dillin and K. L. Guan. “ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase.” *Nature Cell Biology*. 2013, 15(7), 741.
41. A. Salminen. “Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: the potential role of Beclin 1 interactome.” *Progress in Neurobiology*. 2013, 106-107, 33-54.
42. T. Feng, P. Tammineni, C. Agrawal, Y. Y. Jeong and Q. Cai. “Autophagy-mediated

- regulation of BACE1 trafficking and degradation.” *The Journal of Biological Chemistry*. 2016.
43. C. Parr, R. Carzaniga, S. M. Gentlemen, F. V. Leuven, J. Walter and M. Sastre. “Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein.” *Molecular and Cellular Biology*. 2012, 32(21), 4410-4418.
44. M. E. Orr and S. Oddo. “Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer’s disease.” *Alzheimer's Research & Therapy*. 2013, 5(5), 53.
45. P. Nilsson, K. Loganathan, M. Sekiguchi, Y. Matsuba, K. Hui, S. Tsubuki, M. Tanaka, N. Iwata, T. Saito and T. C. Saido. “A β secretion and plaque formation depend on autophagy.” *Cell Reports*. 2013, 5(1), 61-9.
46. Z. Cai, Y. Zhou, Z. Liu, Z. Ke and B. Zhou. “Autophagy dysfunction upregulates beta-amyloid peptides via enhancing the activity of γ -secretase complex.” *Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2015, 11, 2091-2099.
47. A. Kundu, N. Milosch, P. Antonietti, F. Baumkötter, A. Zymny, U. C. Müller, S. Kins, P. Hajieva, C. Behl and D. Kögel. “Modulation of BAG3 expression and proteasomal activity by sAPP α does not require membrane-tethered holo-APP.” *Molecular Neurobiology*. 2016, 53(9), 5985-5994.
48. N. Milosch, G. Tanriöver, A. Kundu, A. Rami, J. C. François, F. Baumkötter, S.W. Weyer, A. Samanta, A. Jäschke, F. Brod, C. J. Buchholz, S. Kins, C. Behl, U. C. Müller and D. Kögel. “Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP α -induced activation of the Akt survival pathway.” *Cell Death & Disease*. 2014, 5(8), e1391.
49. L. Miller, R. Daum, B. Creech, D. Young, M. Downing, S. Eells, S. Pettibone, R. Hoagland and H. Chambers. “Clindamycin versus trimethoprim–sulfamethoxazole for uncomplicated skin infections.” *The New England Journal of Medicine*. 2015, 372(12), 1093-103.
50. R. Leclercq. “Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications.” *Clinical Infectious Diseases*. 2002, 34(4), 482-92.
51. G. Thinakaran and E. H. Koo. “Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing and Function.” *The Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283(44), 29615-29619.
52. A. Meléndez and B. Levine. “Autophagy in *C. elegans*.” *WormBook*. 2009.
53. N. Mizushima. “The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide.” *Cell Death & Differentiation*. 2005, 12, 1535-41.
54. S. S. Ebada. “Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates.” *Nature Protocols*. 2008, 3(12), 1820-31.

- 
55. H. Wang, A. Megill, K. He, A. Kirkwood and H. Lee. “Consequences of inhibiting amyloid precursor protein processing enzymes on synaptic function and plasticity.” *Neural Plasticity*. 2012.
56. K. Kosik. “Tau Protein and Neurodegeneration.” *Molecular Neurobiology*. 1990, 171-79.
57. G. Glenner and C. Wong. “Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984, 885-90.
58. I. Tanida, I. N. Minematsu, T. Ueno and E. Kominami. “Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker of autophagy.” *Autophagy*, 2005, 1, 84-91.
59. I. Tanida I, Y. S. Sou, J. Ezaki, I. N. Minematsu, T. Ueno and E. Kominami. “HsAtg4B/ HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABA receptor-associated protein-phospholipid conjugates.” *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279, 36268-76.
60. S. Barth, D. Glick and K. F. Macleod. “Autophagy: assays and artifacts.” *The Journal of Pathology*. 2010, 221(2), 117-124.
61. S. Kimura, N. Fujita, T. Noda and T. Yoshimori. “Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3.” *Methods Enzymol*. 2009, 452, 1-12.
62. M. Sahani, E. Itakura and N. Mizushima. “Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids.” *Autophagy*. 2014, 10(3), 431-441.
63. D. J. Klionsky *et al.*, “Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.” *Autophagy*. 2016, 12(1), 1-222.
64. P. Kao. “Clindamycin upregulated soluble amyloid precursor protein α through autophagy flux impairment.” *National Taiwan University*. 2015.