

蘇合香이 신경 세포에서 베타 아밀로이드 분비에 미치는 영향

임재윤*

우석대학교 약학대학

Effects of StyraX Liquides on the Secretion of β -amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells

Jae Yoon Leem*

College of Pharmacy, Woosuk University

Alzheimer's disease (AD) is characterized pathologically by the presence of intracellular neurofibrillary tangles and deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptides. It is urgent to develop effective therapies for the treatment of AD, since our society rapidly accelerate aging. $A\beta$ peptides have been believed to be neurotoxic and now are also considered to have affects on the mechanism of memory formation, which are generated by processing of amyloid precursor protein (APP). In this study, effects of StyraX Liquides (SL) on the metabolism of APP were analyzed. SL inhibited the secretion of $A\beta$ from the Neuro2a cell line (APPswe cell) expressing a mutation of APPswe. Immunoblotting study showed that it inhibited β -site APP cleaving enzyme (BACE) from the APPswe cells. We suggest that SL inhibits APP metabolism and $A\beta$ generation by the means of BACE inhibitory mechanism. This is the first report that SL inhibits the secretion of $A\beta$ peptides from neuroblastoma cells.

Key words : alzheimer's disease, β -amyloid peptides, styraX liquides, APPswe, BACE

서 론

이미 고령화 사회로 진입한 한국은 2010년 현재 노인인구 비율이 11%를 차지하며 치매환자의 수도 급속히 증가하고 있다. 이러한 현실은 개인의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 과도한 의료비 지출로 인한 국가 경쟁력 감소에 따라 커다란 사회·국가적 문제로까지 대두되고 있다¹⁾. 현재 치매 개선약물로서는 acetylcholine esterase 저해제인 donepezil, galantamine 및 rivastigmine 등이 임상에서 사용되고 있으나 치료효율이 낮고 부작용이 심하여 효과적인 치료제가 없는 실정이다^{2,4)}. 치매(dementia)는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 노인 반(senile plaque)의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력과 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지기능 장애 증상을 수반하는 증후군을 일컫는다⁵⁾. 치매는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 혈관성 치매 및 파킨슨 질환에 의한 퇴행성 질환, 갑상선 기능 저하증에 의한 대사성 질환, 뇌종양 또

는 감염성 질환 등에 기인하는 기타 치매로 분류된다⁶⁾. 알츠하이머 질환자의 뇌 조직에서는 신경세포 주위에서 생성되는 노인 반과 세포내부에서 생성되는 neurofibrillary tangle과 같은 병리학적 특징을 관찰할 수 있다^{7,8)}. Neurofibrillary tangle은 tau 단백질의 과인산화에 의하여 형성되며, 노인 반은 세포 밖으로 분비된 β -amyloid ($A\beta$)가 신경세포 주변에서 응집되어 형성된다^{7,8)}.

알츠하이머 질환은 familial type과 sporadic type으로 분류되며, 전체 질환의 90% 이상이 주로 65세 이상의 노인에게 나타나는 sporadic type이다¹⁾. Familial type은 amyloid precursor protein (APP), presenilin 1, presenilin 2 유전자의 돌연변이가 발병원인으로 알려져 있으며⁹⁾, sporadic type의 경우는 그 원인이 노화 및 ApoE4 대립형질인 것으로 보고되었다^{10,11)}. $A\beta$ 의 축적에 의한 노인 반은 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상이다. $A\beta$ 는 베타 아밀로이드 전구 단백질인 APP(Amyloid precursor protein)가 2 종류의 protease에 의해 분해되어 생기는데, 아미노 말단을 절단하는 것이 β -secretase¹²⁾, 카르복시 말단을 절단하는 것이 γ -secretase이다¹³⁾. 알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 presenilin (PS), nicastrin (NCT)과 anterior pharynx defective

* 교신저자 : 임재윤, 전북 완주군 삼례읍 삼례로 333 우석대학교 약학과

· E-mail : jyileem@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1575

· 접수 : 2009/12/23 · 수정 : 2010/01/08 · 채택 : 2010/01/21

gene의 단백질 산물인 APH-1, presenilin enhancer gene의 단백질 산물인 PEN-2 등으로 이루어진 complex 로서 활성을 나타낸다. 그러나 이 효소는 Notch1, APLP1, ErbB4, Jagged, CD44 등 많은 물질을 기질로 반응하므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야 하는 문제점을 안고 있다^{14,17}. β -secretase는 aspartyl protease의 특성을 가진 β -site APP cleaving enzyme (BACE)¹²으로서 knock out 생쥐는 정상적으로 발육하였으며 뇌에서도 특별한 이상은 관찰되지 않았다¹⁸. 따라서 BACE 저해제는 생체에 유해하지 않을 것으로 추측되므로 BACE가 치매 치료제 개발의 중요한 표적이 되고 있다. 또 다른 대사산물인 P3 단편은 α -secretase와 γ -secretase에 의해 생성되며 A β 와는 달리 신경세포에 대한 독성은 없는 것으로 알려져 있다. APP는 기질로서 α -secretase와 β -secretase에 의해 경쟁적으로 대사되므로 α -secretase의 효소활성이 증가되면 BACE의 활성이 감소된다¹⁹.

한편, 蘇合香樹 (*Liquidambar orientalis* Miller, 金縷梅科 Hamamelidaceae)의 수지인 蘇合香 (Styrax Liquidus)은 임상적으로 정신을 맑게 하고 혈액순환을 촉진하므로 중풍, 협심증, 관상동맥질환 등에 사용한다. 東醫寶鑑, 濟衆新編, 方藥合篇 등 여러 의서에 기(氣)로 인한 모든 질병을 다스리는 약제로 수록되어 있다. 이 약제의 효능은 모든 기담(氣痰)과 중기(中氣)·상기(上氣)·기역(氣逆)·기울(氣鬱)·기통(氣痛) 등의 증세를 다스린다고 기록되어져 있으며 최근 항균작용에 대한 보고가 있다²⁰.

본 연구에서는 蘇合香이 APP의 변이 유전자인 APPsw를 발현하는 신경세포주로부터 A β 의 분비를 감소시켰으며 BACE의 활성을 저해하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포주

APP swedish 유전자가 과잉 발현되는 생쥐유래 신경세포주인 Neuro2a (APPsw)를 동경대학의 Iwatsubo 교수로부터 제공받아 5% FBS (Gibco, Grand Island, NY), L-glutamic acid, penicillin/streptomycin, hygromycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Grand Island, NY)과 OPTI MEM (Gibco, Grand Island, NY)의 혼합 배지에서 37°C, 5% CO₂ 의 조건으로 배양하였다.

2. 시약

蘇合香 (Styrax Liquidus, 이하 'SL'로 약칭)은 경동시장에서 구입하여 일정량의 DMSO에 용해하여 사용하였다. β -secretase inhibitor III (Calbiochem, Darmstadt, Germany), protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT (Stressgen, Victoria, Canada), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), mouse anti-amyloid precursor protein monoclonal antibody 6E10 (BioSource, Camarillo, CA), goat anti-Presenilin 1 polyclonal antibody N-19 (Santa cruz Biotech., Santa cruz, CA), rabbit anti-actin

polyclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO), human amyloid β assay kit (IBL, Kunma, Japan)를 사용하였고 그 밖의 시약은 등급을 사용하였다.

3. A β 의 분비에 대한 효과검정

APPsw 세포주로부터 분비되는 A β 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA²¹를 실시하였다. 1×10^6 세포를 60 mm dish에서 배양하여 serum-free DMEM으로 교환하고 16 시간이 경과한 후 DMSO에 용해시킨 SL 5, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor III²² 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 protease inhibitor의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였다. A β (35-40) 특이적 monoclonal antibody 또는 A β (38-42) 특이적 polyclonal antibody가 각각 coating된 plate에 100 μl 의 시료를 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시키고 7회 세척한 후, HRP conjugation된 A β (11-28) 특이적 monoclonal antibody를 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 9회 세척한 후 tetramethyl benzidine (TMB) 기질액을 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 정지액을 100 μl 첨가하여 450 nm에서 Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4. 단백질 분석

단백질 분석은 Western blotting 방법에 의해 수행하였다²³. 1×10^6 세포를 60 mm dish에서 배양하여 24시간 후에 DMSO 또는 SL 5, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였다. 24 시간 후, 배양액을 PMSF 존재 하에 회수하고 PBS로 세척한 세포에 protease inhibitor를 첨가한 cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA)를 넣고 분쇄하여 시료로 사용하였다. 단백질 50 μg 을 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE 및 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP, PSI, β -CTF (COOH terminal fragment), sAPP(soluble APP), sAPPa 등의 단백질 양상을 검출하였다. 단백질 밴드를 Image J 1.37 software (NIH 제공)에 의해 정량하였으며 actin 밴드를 기준으로 보정하였다.

5. 통계처리

각 실험군 간의 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며, P값이 0.05 및 0.01 이하를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

1. A β 분비 저해효과

APPsw 세포주에 SL 각각 5, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 후 배양액으로 분비된 A β 의 양을 sandwich ELISA 방법으로 측정하여 비교 정량한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 음성 대조군(C)인 DMSO를 처리한 시료의 A β 의 분비량을 100%로 하여 SL 처리시 분비량을 백분율로 표시하였다. SL 5, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 A β 40의 분비량이 각각 음성대조군의 각각 64.2, 38.5%이었으며 A β 42의 분비

량은 더욱 감소하여 각각 60.3, 32.1%이었다. 즉, SL은 Aβ의 분비량을 농도 의존적이며 유의성 있게 감소시켰다. 양성 대조군인 β-secretase inhibitor III도 저해 활성을 나타내었다(자료 미제시). 서론에서도 기술한 바와 같이, APP의 대사에 관여하는 β-secretase 또는 γ-secretase의 활성이 저해될 경우 Aβ 분비가 감소된다²⁴). SL에 의한 Aβ 분비 감소효과도 이들 효소활성의 저해가 원인일 것으로 예측되어 BACE에 의한 APP의 대사체인 β-CTF와 α-secretase에 의한 대사체인 sAPPα의 단백질 양상을 분석함으로써 β-secretase의 효소활성을 간접적으로 측정하였다. 또한, PS의 단백질 양상분석을 통하여 SL의 γ-secretase에 대한 영향을 분석하였다. 한편, APP^{swe} 세포주에 대한 MTT assay를 실시하였으나 세포독성은 관찰되지 않았다(자료 미제시).

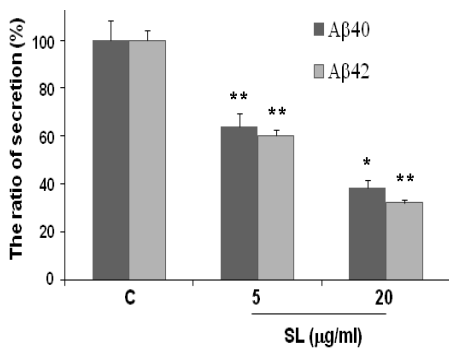


Fig. 1. Effects of SL on the secretion of Aβ peptides. APP^{swe} cells were treated with DMSO(control), 5, or 20 μg/ml of SL for 24h and collected conditioned media in the presence of protease inhibitor. Quantitative analysis of secreted Aβ x-40 and Aβ x-42 in the conditioned media was performed using sandwich ELISAs. The secreted Aβ peptides were specifically decreased in the presence of SL. The means ± SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01 SL: StyraX Liquides, Aβ; β-amyloid, C: control

2. APP 및 관련 단백질 양상에 미치는 효과

APP^{swe} 세포주에 SL 각각 5, 20 μg/ml을 처리하고 24시간 경과 후, 배양액 및 세포 lysate를 회수하여 Western blotting에 의해 APP, β-CTF, PS, sAPP, sAPPα의 단백질 양상을 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. SL은 세포내 APP의 양을 약간 증가시키는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 세포외로 분비되는 전체 soluble APP의 양에는 변화가 없었다. 또한 γ-secretase의 구성분자인 PS1의 아미노 말단 단편인 PS1-NTF도 아무런 변화가 없었다. 이 결과를 통하여 holo APP 및 APP의 최종 대사과정에 관여하는 효소 γ-secretase 복합체의 중요한 구성분자중 하나인 PS-NTF의 안정성에는 영향이 없으며, 다른 구성분자인 PS1-CTF, NCT, PEN2, APH-1 등의 안정성에도 변화가 없음을 예상할 수 있다. 그러나 BACE에 의한 대사 물질인 β-CTF의 경우는 SL의 농도 의존적으로 감소 양상을 보여, DMSO 처리군(C)에 비해 SL 20 μg/ml 농도에서 73%가 감소되었다(Fig. 3A). 이 결과는 SL이 직접 BACE를 억제할 가능성을 시사한다. 한편, sAPPα의 세포외 분비량은 음성대조군(C)에 비해 1.8배 증가하였다(Fig. 3B). sAPPα의 분비량이 증가한 것은 α-secretase의 활성이 증가했음을 의미하는 것으로 동시에 경쟁적으로 기질과 반응

하는 β-secretase의 활성은 감소되었음을 시사한다. β-CTF와 sAPPα의 단백질 양상은 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이, 서로 상반되는 결과를 나타냈다. 이 결과로부터 SL은 BACE를 저해한다고 결론지을 수 있다.

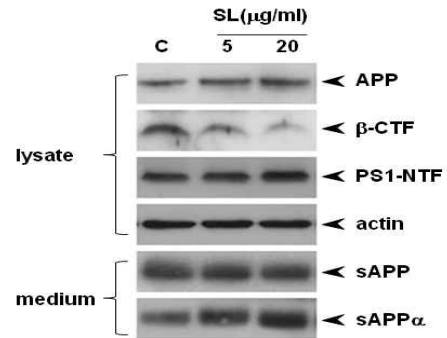


Fig. 2. Effects of SL on the protein level of APP, β-CTF, PS1, sAPP, sAPPα. APP^{swe} cells were treated with DMSO(control), 5, or 20 μg/ml of SL for 24h, then collected conditioned media and lysed with cell lysis buffer. Medium or detergent lysates were loaded on the 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE, or 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit anti-APP polyclonal antibody, rabbit anti-PS1 polyclonal antibody, rabbit anti-actin polyclonal antibody, or anti-APP monoclonal antibody. Note that β-CTF was decreased and sAPPα was increased in a dose dependent manner. Actin was used as a control protein. SL: StyraX Liquides, C: control, APP; Amyloid precursor protein, PS1-NTF; Presenilin 1-NH2 terminal fragment, β-CTF; β-COOH terminal fragment, sAPP; soluble APP, sAPPα: soluble APPα.

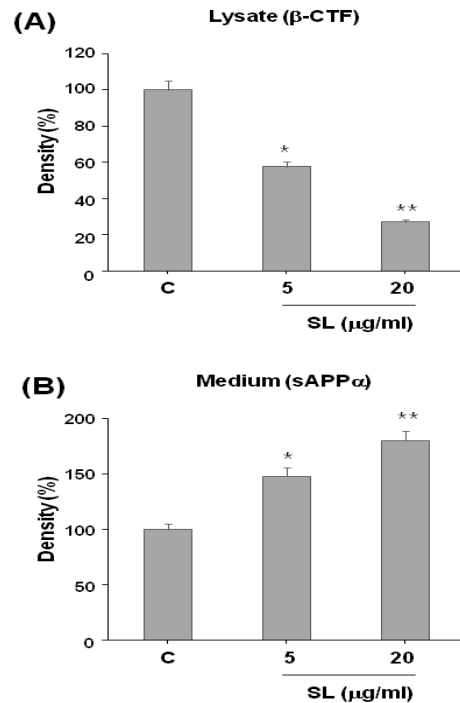


Fig. 3. The quantification of β-CTF and sAPPα for the estimation of BACE activity. The levels of protein, shown in Fig. 2 were analyzed by relative density using Image J 1.37 software. (A) β-CTF of intracellular APP metabolite by BACE was specifically decreased in the presence of SL. (B) sAPPα secreted by α-secretase was specifically increased in the presence of SL. The means ± SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01 SL: StyraX Liquides, C: control, BACE; β-site APP cleaving enzyme, APP; amyloid precursor protein, β-CTF; β-COOH terminal fragment, sAPPα: soluble APPα.

APP는 endoplasmic reticulum (ER)에서 합성되어 golgi체로 이동하며 당의 수식과정을 거쳐 성숙한 APP가 된 후, 다시 trans-golgi network (TGN)를 거쳐 세포막으로 이동한다. 이 과정에서 α -secretase, β -secretase 및 γ -secretase 등에 의해 대사되어 A β 를 비롯한 대사물질을 생성한다^{25,26}). A β 는 oligomer를 형성하며 서로 응집하여 신경세포의 폐쇄를 유발함으로써 비가역적인 퇴행성 파괴를 일으킨다²⁷). 특히 치매 환자의 뇌 및 척수액에서 A β 42가 정상인의 경우보다 많이 검출된다²⁸).

실험에 사용한 APPswe 세포주는 치매환자의 병리와 유사하게 A β 42의 분비량이 정상세포에 비해 2배 이상 증가되어 있어 분비저해 활성을 검색하기에 용이하다²⁹). 위에 기술한 바와 같이, SL은 A β 42의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한, A β 의 생성에 관여하는 β -secretase의 효소활성을 농도 의존적으로 저해하는 것을 간접적으로 확인하였다. 최근 β -secretase 저해제가 치료제 개발의 표적이 되고 있으므로 SL을 치매 약물의 개발을 위한 후보약물로 응용할 수 있다고 사료된다.

향후 蘇合香에 의한 A β 분비저해활성의 기전을 명확히 규명하기 위해서는 면역형광염색법에 의해 APP 및 관련 분자의 세포내 분포를 확인하고, BACE의 in vitro 효소활성도 직접 측정해야 할 것이다. 새로이 합성되는 APP의 경시적인 변화양상을 확인함으로써 APP의 maturation과 trafficking에 미치는 영향 및 γ -secretase의 활성에 대한 영향도 세밀하게 분석해야 할 것이다. 나아가 蘇合香의 유효성분의 규명도 필요하다.

결론

蘇合香은 APP의 대사 과정 중 BACE를 저해함으로써 A β 의 분비를 감소시켰다. 따라서 BACE를 표적으로 하는 치매 치료제 개발의 후보약물로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Vellas, B. and Fitten, L.J. Research and practice in Alzheimer's disease. Springer Publishing Co. 2000.
- Sugimoto, H. Donepezil hydrochloride. a treatment drug for Alzheimer's disease. Chem. Rec. 1: 63-73, 2001.
- Zarotsky, V., Sramek, J.J. and Cutler, N.R. Galantamine hydrobromide. an agent for Alzheimer's disease. Am. J. Health Syst. Pharm. 60: 446-452, 2003.
- Jann, M.W. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. Pharmacotherapy 20: 1-12, 2000.
- Iqbal, K., Sisodia, S.S. and Winblad, B. Alzheimer's disease. Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics. John Wiley & Sons, Ltd. 2001.
- Morris, J.C. Classification of dementia and Alzheimer's disease. Acta Neurol. Scand. 165: 41-50, 1996.
- Braak, H., Braak, E. and Strothjohann, M. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. Neurosci Lett. 171: 1-4, 1994.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325: 733-736, 1987.
- Selkoe, D.J. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol. 8: 447-453, 1998.
- Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., Roses, A.D. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8098-8102, 1993.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261: 921-923, 1993.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science 286: 735-741, 1999.
- Selkoe, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature 399: 23-31 1999.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St. George-Hyslop, P. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. Nature 407: 48-54, 2000.
- Lee, S.F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., Yu, G.

- Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J. Biol. Chem.* 277: 45013-45019, 2002.
16. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. and Haass, C. PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* 277: 39062-39065, 2002.
 17. Hardy, J. and Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356, 2002.
 18. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., Wong, P.C. BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neurosci.* 4: 233-234, 2001.
 19. Fu, H., Dou, J., Li, W., Cui, W., Mak, S., Hu, Q., Luo, J., Lam, C.S., Pang, Y., Youdim, M.B. and Han, Y. Promising multifunctional anti-Alzheimer's dimer bis(7)-Cognitin acting as an activator of protein kinase C regulates activities of alpha-secretase and BACE-1 concurrently. *Eur. J. Pharmacol.* 623(1-3):14-21, 2009.
 20. Sağdıç, O., Ozkan, G., Ozcan, M., Ozçelik, S. A study on inhibitory effects of Siğla tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) storax against several bacteria. *Phytother. Res.* 6: 549-551, 2005.
 21. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E. and Sissodia, S.S. The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. *J. Biol. Chem.* 271: 31894-31902, 1996.
 22. Tung, J.S., Davis, D.L., Anderson, J.P., Walker, D.E., Mamo, S., Jewett, N., Hom, R.K., Sinha, S., Thorsett, E.D., John, V. Design of substrate-based inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* 45: 259-262, 2002.
 23. Leem, J.Y., Saura, C.A., Pietrzik, C., Christianson, J., Wanamaker, C., King, L.T., Veselits, M.L., Tomita, T., Gasparini, L., Iwatsubo, T., Xu, H., Green, W.N., Koo, E.H., Thinakaran, G. A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* 11: 64-82, 2002.
 24. Sambamurti, K., Hardy, J., Refolo L.M. and Lahiri, D.K. Targeting APP metabolism for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* 56: 211-227, 2002.
 25. Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., Lee, V.M. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* 275: 2568-2575, 2000.
 26. Nunan, J., Small, D.H. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 483: 6-10, 2000.
 27. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P. and Selkoe, D.J. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3: 67-72, 1997.
 28. Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., Roher, A.E. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 271: 4077-4081, 1996.
 29. Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T. and Iwatsubo, T. Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces Abeta 42 generation. *J. Biol. Chem.* 278: 18664-18670, 2003.