

## APP 대사과정의 Alpha-secretase의 활성을 조절하는 Furin의 역할 규명

황은미 · 심혜진 · 묵인희

아주대학교 의과대학 뇌질환연구센터

### Address for correspondence

Inhee Mook-Jung, Ph.D.  
Brain Disease Research Center,  
Ajou University School of Medicine,  
San 5, Wonchon-dong, Paldal-gu,  
Suwon 442-721, Korea  
Tel: +82-31-219-4554  
Fax: +82-31-219-4540  
E-mail: inhee@ajou.ac.kr

\*본 연구는 보건복지부 뇌의약연구센터 과제(01-PJ8-PG6-01NE01-0003)로 지원받아 이루어진 것임.

## Furin is an Important Regulator on Alpha-secretase Associated APP Processing

Eun Mi Hwang, Heajin Sim, Inhee Mook-Jung, Ph.D.

Brain Disease Research Center, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Background:** The  $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ , which accumulates in the brains of Alzheimer's disease patients, is derived by proteolysis of the amyloid precursor protein (APP). APP can undergo endoproteolytic processing at three sites, one at the amino terminus of the A $\beta$  domain (by  $\beta$ -secretase), one within the A $\beta$  domain (by  $\alpha$ -secretase), and one at the carboxyl terminus of the A $\beta$  domain (by  $\gamma$ -secretase). Constitutive and PKC-regulated  $\alpha$ -secretase pathways have been reported to secrete sAPP $\alpha$ . In both pathways, we examined mechanisms of furin, which is known to regulate  $\alpha$ -secretase activity. **Methods:** Two methods were used to inhibit the activity of furin: overexpression of prodomain of furin and the infection of furin-specific inhibitor  $\alpha$ -1-PDX adenovirus in a COS-7 cell. Real-Time PCR was used to determine the level of mRNA of furin in both the APP transgenic mice and age-matched control mice. **Results:** As a result of inhibiting the activity of furin, the level of sAPP $\alpha$  was significantly decreased regardless of the PKC activity, and the total level of APP did not change as well. In a real-time PCR, there was a significant decrease in the mRNA of furin in APP transgenic mice compared to that of control. **Conclusion:** Our results suggest that furin plays an important role in the processing of APP through  $\alpha$ -secretase and that the decrease in the level of furin may be closely related to the mechanisms that lead to Alzheimer's disease.

**Key Words:** Alzheimer's disease, Furin, Alpha-secretase, Tg2576

## 서론

노인성 치매의 대표적인 퇴행성 신경질환인 알츠하이머병은 세포밖에서 관찰되는 노인반(senile plaques)과 세포내에서 관찰되는 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangle)의 병리학적인 특징을 보인다. 이 중 노인반의 경우, 노인반을 구성하는 중요한 구성 물질로서 베타아밀로이드 단백질이 알려졌다. 이것은 전구 물질인 아밀로이드 전구단백질(Amyloid Precursor Protein, APP)의 대사과정에서 생성된다[1]. APP는 Type 1 membrane glycoprotein으로서 단백질 분해효소인 알파시크리타제와 베타시크리타제, 그리고 감마시크리타제에 의해서 특이적으로 대사되는데, APP가 알파시크리타제와 감마시크리타제에 의해 절단되는 경우  $\alpha$ -secretase derived secreted form of APP (sAPP $\alpha$ )와 p3, 감마시크리타제에 의해 절단된 APP C단 단백질( $\gamma$ -secretase derived C-terminal fragment of APP,

CTF $\gamma$ )을 생성하고, 베타시크리타제와 감마시크리타제에 의해서 절단될 경우  $\beta$ -secretase derived secreted form of APP (sAPP $\beta$ )와 신경독성의 베타아밀로이드, CTF $\gamma$ 를 생성하게 된다. 알파시크리타제와 베타시크리타제는 APP라는 동일한 기질에 작용하는 효소이며 알파시크리타제의 활성이 증가하면 신경독성의 베타아밀로이드 생성이 억제되므로 두 효소의 활성이 조절되는 기전을 연구하는 것은 알츠하이머병의 병인기전을 규명하는데 매우 중요한 일이다.

알파시크리타제의 활성을 보이는 효소로는 a Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 계열의 효소들이 중요한 후보로 알려졌다. 이는 APP와 유사하게 대사되는 Notch 단백질과 연관되어서 비교되어 왔다. 특히 Notch의 S1 절단에 관여하는 것으로 알려진 ADAM10의 경우, 과발현하면 sAPP $\alpha$ 의 양을 급격하게 증가시키므로 알파시크리타제 역할을 할 것으로 추정되었으며, ADAM17의 경우, knockout mice에서 PKC를 활성화

시커도 sAPP $\alpha$ 의 양을 변화시키지 않으므로, PKC에 의해서 조절되는 또 하나의 알파시크리타제가 존재할 것으로 추정되고 있다[2-8]. 또한 다른 ADAM 계열인 ADAM9을 과발현하여도 sAPP $\alpha$ 의 양이 증가하므로, 알파시크리타제의 역할을 하는 ADAM 계열의 효소가 하나 이상 존재할 가능성이 있다[9]. ADAM 계열의 효소는 Zymogen으로서 Proprotein Convertase (PC)에 의해서 그 활성이 조절되는데, 알파시크리타제의 활성을 조절하는 것으로 알려진 PC 계열의 효소는 furin과 PC7 두 가지가 알려져 있다. Furin은 대부분의 세포에서 발현되고 endoplasmic reticulum (ER)에서 전구물질의 형태로 합성되며, auto-catalytic 활성을 가지므로 자신의 prodomain을 제거하고 active한 형태로 전환되는 것으로 보고되어 왔다[10, 11]. Prodomain부분은 단백질의 N-terminal에 존재하며 효소가 완전하게 합성될 때까지 활성을 가지지 못하도록 하는 억제 작용을 하고, 합성이 완결되어 적절한 기질과 만나게 되면 잘려져 분해되어 효소를 활성 상태로 바꾸어 주게 된다. 이때, Prodomain부분만을 과다발현하거나 합성하여 처리해 주면 그 활성이 효소에 특이적으로 저해됨이 밝혀졌으며, 같은 PC 계열에 속하는 PC7에서도 같은 효과를 보이는 것이 보고되었다[12, 13].

Furin은 APP가 대사되는 과정에서 알파시크리타제 전환효소로서 작용한다는 사실이 최근에 보고되기 시작했으며, 알파시크리타제 candidate로 알려진 ADAM10과 ADAM17이 모두 furin의 절단 부위로 알려진 RKRR 서열을 가지고 있는 것이 확인되었다[3]. ADAM10과 ADAM17은 furin과 마찬가지로 비활성의 전구물질로 합성되는데, auto-catalytic 활성이 없기 때문에 기질과 만나서 활성 상태가 되기 위해서는 furin과 같은 효소에 의한 prodomain의 절단이 필수적이다. Furin을 과발현하였을 경우, ADAM10과 ADAM17의 활성을 가진 mature form이 증가함이 보고되었고[4, 14], PC 계열 효소에 특이적인 저해제나  $\alpha$ -1-PDX처럼 furin에 특이적인 저해제를 처리했을 때 ADAM17의 mature form이 감소하는 것이 보고되었다[15]. 또한 최근 연구에서 furin이 알츠하이머병 환자의 뇌에서 미성숙한 노인반에 APP와 함께 위치함이 보고되었는데, 이는 furin이 알츠하이머병과 실제로 연관되어 APP 대사의 조절 기전에 관여하고 있을 가능성을 제시하고 있다[16]. 본 연구에서는 sAPP $\alpha$  생성에 필수적인 알파시크리타제의 활성을 조절하는데 관여할 것으로 추측되어지는 furin의 sAPP $\alpha$  생성에 있어서의 알파시크리타제 활성 조절 기전을 살펴보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포배양

COS-7 cell은 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM,

HyClone, Irvine, CA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

### 2. Furin Prodomain 클로닝과 transfection, $\alpha$ -1-PDX adenovirus 감염

Furin prodomain의 클로닝은 HEK293 cell로부터 RT-PCR을 통해 수행되었으며, 자세한 방법은 Zhong et al.[12]의 논문에서 사용된 방법을 따랐다. 60 mm dish에  $5 \times 10^5$ 의 세포를 분주하여 1일 배양후 serum-free DMEM 배지로 교환한 후 1 mL의 DMEM에 각각 furin prodomain cDNA를 0, 0.3, 3  $\mu$ g 넣고 15  $\mu$ L의 lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 첨가하여 4시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Growth media로 배지를 교환하고 2일이 경과한 후 serum-free DMEM에 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 1  $\mu$ M 농도로 처리하여 4시간 후에 media를 Trichloroacetic acid (TCA) precipitation하였다.  $\alpha$ -1-PDX adenovirus (Applied Biosystems, Foster City, CA)는 감염 후 2일 경과하여 serum-free DMEM으로 교환하고, PMA를 1  $\mu$ M 농도로 처리하여 4시간 후에 media를 TCA precipitation하였다.

### 3. Western Blotting

배양된 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 RIPA buffer를 넣고 세포를 모아서 원심분리하여 상층액을 얻는다. 정량된 20 mg의 단백질을 7.5% SDS/PAGE에서 분리하고 PVDF membrane에 transfer하여 5% non-fat milk로 blocking한다. Total APP를 확인하기 위해서 APP의 C-terminal을 인지하는 Rb767 antibody를 1:5,000 사용하였으며 sAPP $\alpha$ 를 확인하기 위해서는 TCA precipitation된 sample에 6E10 (Senetek, Maryland, MO)을 1:2,000 사용하였다. 적절한 Horseradish peroxidase (HRP)-secondary antibody와 1시간 동안 배양한 후 ECL substrate (Amersham Biosciences, Piscataway, NY)와 반응시켰으며, Imaging System (LAS-100, Fujifilm Medical Systems, Stamford, CT)을 이용하여 정량하였다.

### 4. Real-Time RCR

24주된 Swedish APP gene을 과발현하는 형질전환 생쥐인 TG2576 mouse와 age-matched littermate로부터 대뇌부분을 적출하여 Trizol (Gibco BRL, Rockville, MD)을 이용하여 total RNA를 얻었으며 MMRV-RT (Promega, Madison, WI)와 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 two-step RT-PCR을 수행하였다. 사용된 primer sequence는 beta-actin 5'-CGTGCGTGACATCA-AAGAGAA-3', 5'-AACCGCTCGTTGCCAATAGT-3', furin

5'-GCGAGACCTGAATGTGAAGGA-3', 5'-CATAATTGCTGTAGGTCGG-3'이며, PCR 조건은 50°C 2분, 95°C 10 min 이후에 95°C 30초, 60°C 1분을 40회 반복하였다.

## 결 과

### 1. Furin의 prodomain 과발현

Furin은 일종의 zymogen으로서 full-length가 발현되면, prodomain부분이 switching역할을 하면서 효소의 활성을 억제하며, prodomain부분이 잘리면서 분해되면 효소의 활성이 생성되는 특징을 가지고 있다. 실제 prodomain부분만을 세포 내에서 과발현하거나, prodomain의 일부분을 peptide 합성하여 in vitro assay하였을 때, 효과적으로 furin의 활성을 억제한다는 보고가 있었고[12, 13], 이는 다른 저해제를 사용하였을 때보다 PC 계열의 효소들과 뚜렷이 구별되는 기질 특이성을 가진다. Furin의 prodomain부분인 amino acid 1-109까지의 preprosegment 부분을 RT-PCR방법을 통해 cloning하여 세포 내에서 과발현하였을 경우, endogenous한 APP의 양에는 영향을 주지 않았지만, 분비되는 sAPP $\alpha$ 의 양을 감소시키는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 이 때, PKC activator인 PMA를 처리하여 PKC를 활성화시킨 경우나 활성화시키지 않은 경우 모두 transfection한

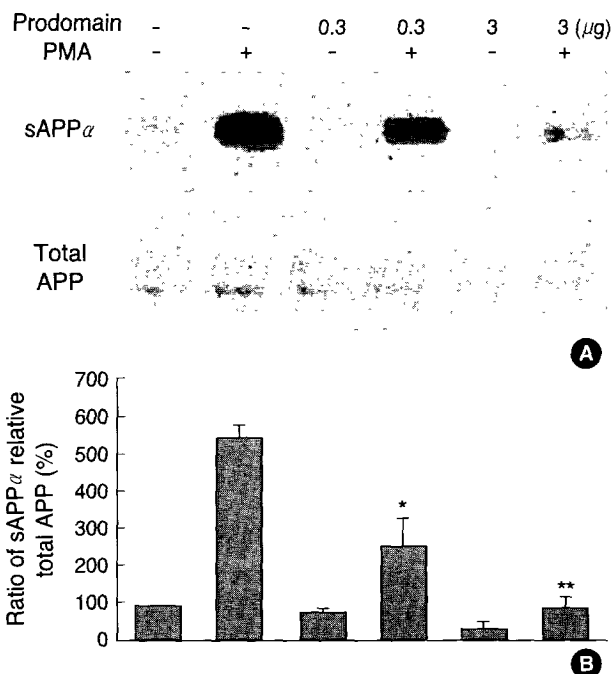


Fig. 1. Furin의 prodomain 과발현에 의한 sAPP $\alpha$ 의 생성량 변화. (A) Furin prodomain DNA transfection에 의한 sAPP $\alpha$ 의 생성량을 Western blot으로 확인, (B) Total APP양에 대한 sAPP $\alpha$ 의 양의 정량화(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ )

prodomain의 농도에 의존적으로 sAPP $\alpha$ 의 양이 감소하였으며, total APP의 양에는 영향을 주지 않았다(Fig. 1). 이는 furin의 활성 억제가 total APP의 발현에는 영향을 주지 않으면서, 효과적으로 constitutive pathway와 PKC-regulated pathway를 억제하여 알파시크리타제의 활성을 감소시키는 역할을 하는 것으로 보여진다.

### 2. Furin 특이적 억제제인 $\alpha$ -1-PDX adenovirus Infection

Furin의 활성을 억제하는 특이적 저해제로 널리 알려진  $\alpha$ -1-antitrypsin portland ( $\alpha$ -1-PDX)는  $\alpha$ -1-antitrypsin의 mutant form으로서 세포 내에서 과발현하였을 경우, furin의 활성을 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있으므로[12], furin의 활성을  $\alpha$ -1-PDX를 이용하여 억제하였을 때에도 역시 알파시크리타제의 활성이 영향받는 지 확인하기 위해 이번에는 Adenovirus를 이용하여 세포 내에서  $\alpha$ -1-PDX를 과발현하고 그 결과를 살펴 보았다.  $\alpha$ -1-PDX Adenovirus를 감염시킨 후 2일이 경과하여 그 발현량이 최고조에 이르렀을 때 Fig. 1에서의 경우와 마찬가지로 PKC activator인 PMA를 처리하여 PKC를 활성화시킨 경우와 활성화시키지 않은 경우를 비교하여 보았다. 그 결과,  $\alpha$ -1-PDX를 과발현시키면, sAPP $\alpha$ 의 양이 두 가지 경우에서 모두 감소하였으며, 이 때 total APP의 양에는 역시 변화가 없었다(Fig. 2A). 또한, APP가 알파시크리타제에 의해서 분비되고 세포 내에 남아있는 C-terminal fragment (CTF $\alpha$ )의 양을 확인한 결과, 역시  $\alpha$ -1-PDX를 감염시켜서 furin의 활성을 억제하면 sAPP $\alpha$ 의 양과 비례하여 그 양이 감소되는 것을 관찰하였다(Fig. 2B). 이로써 furin의 활성을 특이적으로 저해하였을 때 알려진 sAPP $\alpha$ 의 두 가지 분비 경로가 현저하게 감소하는 것이

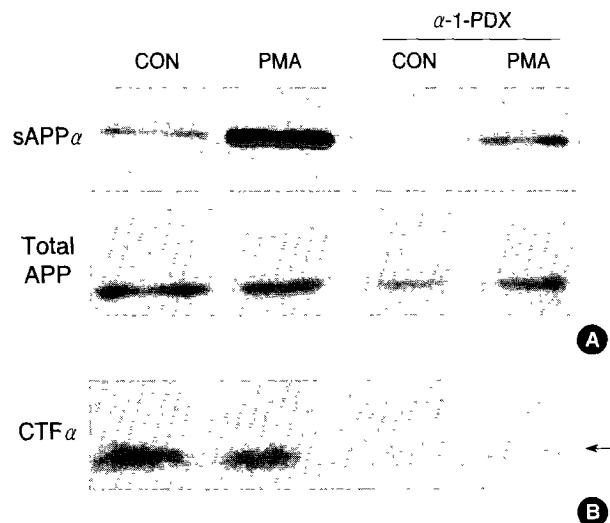


Fig. 2. Furin 특이적 억제제인  $\alpha$ -1-PDX Adenovirus 감염에 의한 sAPP $\alpha$ 의 생성량 변화. (A)  $\alpha$ -1-PDX Adenovirus 감염 전후의 sAPP $\alpha$  생성량 측정, (B)  $\alpha$ -1-PDX Adenovirus 감염 전후의 CTF $\alpha$  생성량 측정.

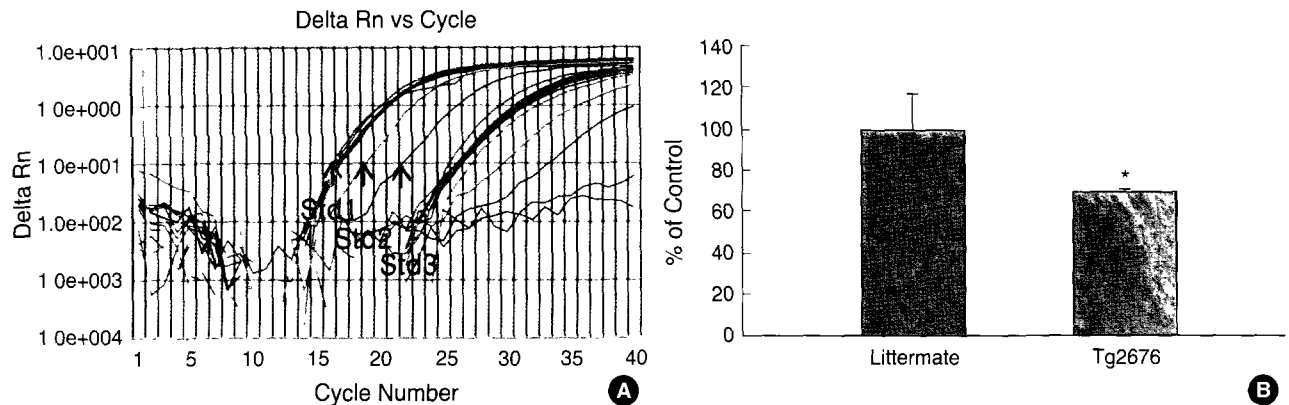


Fig. 3. swAPP 과발현 생쥐 Tg2576 mice에서의 furin mRNA 발현량. (A) Real-time PCR 실험에서 사용된 standard curve (std1 50 ng, std2 5 ng, std3 0.5 ng RT), (B) 3회 반복실험 후 Tg2576 mice와 littermate mice사이의 furin mRNA 발현량 비교(\*:  $p < 0.05$ ).

확인되었으며, 따라서, 이 과정에 필수적인 알파시크리타제의 활성이 furin에 의해서 조절된다는 강력한 증거를 얻게 되었다.

### 3. APP transgenic mice에서 Furin mRNA 양의 비교

Swedish APP를 과발현하는 형질전환 생쥐인 Tg2576 mice는 베타아밀로이드를 정상쥐 보다 과량 생성하여 알츠하이머병의 대표적인 특징인 노인반을 보여주는 알츠하이머병 동물모델이다[17]. Furin의 활성이 알츠하이머병의 병인 기전에 영향을 주는지 여부를 알기 위해 Tg2576 mice에서 furin의 발현량을 Real-Time PCR방법을 이용하여 확인하였다. Furin은 auto-catalytic한 활성을 가지는 효소로 알려져 있으므로 발현량과 활성이 비례적인 관계에 있으며, Real-Time PCR방법을 이용하면 beta-actin의 양에 대비하여 furin의 양을 정량화하는 것이 가능하다. Transgenic mice와 littermate 각각 8마리로부터 대뇌 부분을 적출하여 total RNA를 추출하였고, two-step RT-PCR방법으로 furin mRNA 양을 확인하였다. Standard로 사용한 50, 5, 0.5 ng의 RT로부터 PCR한 결과가 일률적이었으므로 이 양에 비례하여 Tg2576에서의 furin mRNA 양을 통계처리해 보면, littermate에 비하여 30% 정도 그 양이 감소된 것을 관찰하였다(Fig. 3). 결과에 표시하지는 않았지만, 어린 쥐에서도 동일한 실험을 수행하였고 역시 furin mRNA가 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 Tg2576에서 furin의 발현이 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었고, 이는 furin의 활성 저하가 알츠하이머병을 유발하는 하나의 원인이 될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

## 고 찰

베타아밀로이드는 전구물질인 APP가 베타시크리타제와 감마시크리타제의 대사과정을 통해서 생성되는데, 만약 알파시크리타제가 먼저 대사 될 경우 베타아밀로이드가 생성될 수 없으므로, 베타시크리타제와 알파시크리타제의 활성에 대한 연구는 같은 기질을 공유하는 효소의 관점에서 경쟁적인 관점으로 생각되어져 왔다. 베타시크리타제는 BACE라는 단백질이 관여하면서 많은 연구가 진행되어 졌지만 알츠하이머병에서 BACE의 발현량에는 변화가 없는 것으로 보고되었고, 그 활성에 대한 연구는 아직 명확한 결론을 내리지 못하고 있다. 알파시크리타제의 경우는 Notch의 경우와 유사하게 ADAM 계열의 효소가 그 역할을 할 것이라고 추정되어 왔으며, 과발현에 의한 효과를 관찰한 연구가 대부분을 이루고 있다[2-8]. 또한, ADAM 계열의 효소들이 proprotein convertase (PC) 계열의 효소들에 의해 그 활성이 조절되는 것이 알려지면서, 알파시크리타제로 작용하는 ADAM의 활성을 특이적으로 조절하는 PC에 대한 연구도 함께 진행되어 왔다[5]. 현재까지 PC 계열 중 furin과 PC7이 알파시크리타제 후보단백질인 ADAM10과 ADAM17의 활성을 조절하는 것으로 보고되었는데, furin의 경우 대부분의 세포에서 발현되며 특히 뇌에도 많은 양이 존재하는 것이 알려져 있다[18]. 본 실험에서는 furin의 활성을 prodomain transfection과 특이적 저해제인  $\alpha$ -1-PDX adenovirus 감염을 통해 저해시킴으로서 endogenous APP의 분비 과정이 조절되는 기전을 살펴보고자 하였다[15]. 그 결과, 알파시크리타제의 활성이 효과적으로 감소되는 것을 확인하였으며, 이는 furin이 알파시크리타제의 활성을 조절하는 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다. 또한, 이전의 real-time PCR 결과에 의하면, 알츠하이머병 환자에서 베타시크리타제로 알려진 BACE mRNA의 양에는 변화가 없으며, 알파시크리타제로 추정되는 ADAM10 mRNA의 양이 다소 증가하는 것으로 보고되었는데[19], 이는 알츠하이머병에서 베타시크리타제의 활성이 변화되지 않으며, 알파시크리타제의 활성이 변화되어 베타아밀로이드 생성을 조절할 수 있다는 하나의 증거가 될 수 있다. 본 연구는 알파시크리타제의 활성을 조절할 것으로 생각되는 PC 계열의 furin mRNA의 양이 알츠하이머병 동물모델에서 유의하게 감

리타제가 먼저 대사 될 경우 베타아밀로이드가 생성될 수 없으므로, 베타시크리타제와 알파시크리타제의 활성에 대한 연구는 같은 기질을 공유하는 효소의 관점에서 경쟁적인 관점으로 생각되어져 왔다. 베타시크리타제는 BACE라는 단백질이 관여하면서 많은 연구가 진행되어 졌지만 알츠하이머병에서 BACE의 발현량에는 변화가 없는 것으로 보고되었고, 그 활성에 대한 연구는 아직 명확한 결론을 내리지 못하고 있다. 알파시크리타제의 경우는 Notch의 경우와 유사하게 ADAM 계열의 효소가 그 역할을 할 것이라고 추정되어 왔으며, 과발현에 의한 효과를 관찰한 연구가 대부분을 이루고 있다[2-8]. 또한, ADAM 계열의 효소들이 proprotein convertase (PC) 계열의 효소들에 의해 그 활성이 조절되는 것이 알려지면서, 알파시크리타제로 작용하는 ADAM의 활성을 특이적으로 조절하는 PC에 대한 연구도 함께 진행되어 왔다[5]. 현재까지 PC 계열 중 furin과 PC7이 알파시크리타제 후보단백질인 ADAM10과 ADAM17의 활성을 조절하는 것으로 보고되었는데, furin의 경우 대부분의 세포에서 발현되며 특히 뇌에도 많은 양이 존재하는 것이 알려져 있다[18]. 본 실험에서는 furin의 활성을 prodomain transfection과 특이적 저해제인  $\alpha$ -1-PDX adenovirus 감염을 통해 저해시킴으로서 endogenous APP의 분비 과정이 조절되는 기전을 살펴보고자 하였다[15]. 그 결과, 알파시크리타제의 활성이 효과적으로 감소되는 것을 확인하였으며, 이는 furin이 알파시크리타제의 활성을 조절하는 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다. 또한, 이전의 real-time PCR 결과에 의하면, 알츠하이머병 환자에서 베타시크리타제로 알려진 BACE mRNA의 양에는 변화가 없으며, 알파시크리타제로 추정되는 ADAM10 mRNA의 양이 다소 증가하는 것으로 보고되었는데[19], 이는 알츠하이머병에서 베타시크리타제의 활성이 변화되지 않으며, 알파시크리타제의 활성이 변화되어 베타아밀로이드 생성을 조절할 수 있다는 하나의 증거가 될 수 있다. 본 연구는 알파시크리타제의 활성을 조절할 것으로 생각되는 PC 계열의 furin mRNA의 양이 알츠하이머병 동물모델에서 유의하게 감

소하였다는 것은 결과적으로 알파시크리타제의 활성이 감소하였다는 간접적인 증거가 되며, 따라서, 베타아밀로이드의 생성을 증가시킬 수 있는 중요한 원인이 될 수 있음을 시사하고 있다.

알츠하이머병의 병인 기전 연구에서 베타시크리타제의 활성이 변화하지 않거나 다소 증가한다 하더라도 APP에 대해서 경쟁적 관계에 있는 알파시크리타제의 활성이 점진적으로 감소한다면, 베타아밀로이드의 생성이 점차 증가할 것이다. 그러므로, 알파시크리타제의 활성 감소는 알츠하이머병을 유발하는 또 하나의 원인이 될 수도 있으므로 이에 대한 연구가 앞으로 함께 진행되어야 할 것이다.

### 참고문헌

- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 438-47.
- Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* 2001; 15: 1837-9.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M et al. Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3922-7.
- Fahrenholz F, Gilbert S, Kojro E, Lammich S, Postina R. Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 920: 215-22.
- Lopez-Perez E, Seidah NG, Checler F. Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J Neurochem*. 1999; 73: 2056-62.
- Lopez-Perez E, Zhang Y, Frank SJ, Creemers J, Seidah N, Checler F. Constitutive  $\alpha$ -secretase cleavage of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem* 2001; 76: 1532-9.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, et al. Evidence that tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 1998; 273: 27765-7.
- Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Biochem J* 2001; 357: 787-94.
- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, et al. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an  $\alpha$ -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 1999; 343: 371-375.
- Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 231-5.
- Tomas G. Furin at the Cutting Edge: from Protein Traffic to Embryogenesis and Disease. *Nature (Mol Cell Biol)* 2002; 3: 753-66.
- Zhong M, Munzer JS, Basak A, Benjannet S, Mowla SJ, Decroly E, et al. The Prosegments of Furin and PC7 as Potent Inhibitors of Proprotein Convertases. *J Biol Chem* 1999; 274: 33913-20.
- Basak A, Lazure C. Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem J* 2003; 373: 231-9.
- Endres K, Anders A, Kojro E, Gilbert S, Fahrenholz F, Postina R. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* 2003; 270: 2386-93.
- Borrotto A, Ruiz-Paz S, de la Torre TV, Borrell-Pages M, Merlos-Suarez A, Pandiella A, et al. Impaired Trafficking and Activation of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -converting Enzyme in Cell Mutant Defective in Protein Ectodomain Shedding. *J Biol Chem* 2003; 278: 25933-9.
- Marcinkiewicz M. BetaAPP and furin mRNA concentrates in immature senile plaques in the brain of Alzheimer patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 815-29.
- Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 1998; 152: 307-17.
- Schwab C, Hosokawa M, Akiyama H, McGeer PL. Familial British dementia: colocalization of furin and A $\beta$ 1 amyloid. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003; 106: 278-84.
- Gatta LB, Albertini A, Ravid R, Finazzi D. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *Neuroreport* 2002; 13: 2031-3.