

프리온 병원체에 감염된 마우스 해마부위에서 Malondialdehyde 및 Hydroxynonenal에 의해 수식된 단백질들의 침착

케이스 웨스턴 리저버대학교 의과대학 생리 및 생물리학부¹, 병리학부²

김 재 일^{1*} · 이 형 곤²

Increases in the Proteins Modified by Malondialdehyde and Hydroxynonenal in the Hippocampus of Prion-Infected Mice

Jae-Il Kim^{1*} and Hyung-Gon Lee²

¹Department of Physiology & Biophysics and ²Department of Pathology, Case Western Reserve University School of Medicine, 10600 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44106, USA

Received : March 5, 2008

Accepted : March 24, 2008

Prion diseases, also termed transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are rare and fatal neurodegenerative conditions that affect both humans and animals. Although there is increased evidence that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of these diseases, the direct relationship between an accumulation of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) and the occurrence of oxidative stress has not been studied. In the present study, we have investigated the cellular localization of proteins modified by lipid peroxidation end products and its correlation with PrP^{Sc} accumulation in the brain of mice infected with the ME7 prion strain. Intense immunostaining of malondialdehyde (MDA)- and hydroxynonenal (HNE)-modified proteins were observed in the hippocampus of prion-infected mice. In serial section study, we found that these immunoreactivities were co-localized with glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes as well as with PrP^{Sc}. These results clearly indicate that the heightened oxidative stress in the form of lipid peroxidation is closely associated with PrP^{Sc} accumulation in astrocytes of prion-infected mice.

Key Words: Prion diseases, Oxidative stress, PrP^{Sc}, Lipid peroxidation end products, Astrocytes

서 론

프리온 질환 (prion diseases)은 전염성 해면상 뇌증 (transmissible spongiform encephalopathies; TSEs)이라고도 하고, 사람 및 동물의 중추신경계에 유발되는 만성 퇴행성 신경질환의 일종이다. 사람에서 발병하는 크로이츠펠트 야콥병 (Creutzfeldt-Jakob disease; CJD) 및 쿠루

(kuru), 양에서 발병하는 스크래피 (scrapie) 및 소의 광우병 (bovine spongiform encephalopathies; BSE, 일명 mad cow diseases)이 그 대표적인 질환이다 (17). 질병에 걸린 뇌의 신경병리학적인 병변으로는 전반적인 신경세포의 소실에 의한 해면모양 (spongiform)의 특징과 함께 별아교세포 비대증 (astrocytosis)을 나타내고, 일부의 경우 비정상적인 프리온 단백질 (PrP^{Sc})으로 이루어진 아밀로이드 플라크가 뇌조직에 침착하는 것이 그 특징이다 (17). 이들 질환은 전염성이 강하고 한 번 발병하면 치료가 불가능한 치명적인 질환이다.

질환을 유발하는 프리온 병원체는 핵산이 없는 전염성 입자이고, 단지 구조가 변형된 프리온 단백질 (PrP)로만 이루어진 것으로 생각되고 있다 (2). 정상 세포에 존재하

*교신저자: Jae-Il Kim. Department of Physiology & Biophysics, Case Western Reserve University School of Medicine, 10600 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44106, USA.

Phone: +1-216-368-6862, Fax: +1-216-368-2546,

e-mail: jaeil.kim@case.edu, rokmc563@hotmail.com

**이 논문은 보건복지부 미래보건기술개발사업의 지원에 의하여 연구되었음 (A020007).

는 프리온 단백 (cellular PrP; PrP^C)은 30~35 kDa의 나선 구조 (α -helical)를 가진 단백질이지만, 프리온 단백을 암호화하는 유전자의 돌연변이에 의해서, 또는 외부에서 유입된 비정상적인 감염성 프리온 단백 (PrP^{Sc})과 접촉하는 것에 의해 나선이 풀려 (unfolding) β -sheet로 형태가 변환되면서 단백질 분해효소 (proteinase K)에 저항성을 가지는 비정상적인 PrP^{Sc}로 변형된다는 것이다 (16). 이 PrP^{Sc}는 전염성뿐만 아니라 증식성을 나타내어 결국에는 주위의 신경세포를 선택적으로 사멸시켜 질병을 일으키게 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 PrP^{Sc}가 어떠한 경로 또는 기전을 통해서 직접적인 신경세포 손실을 유발하는지는 정확하게 밝혀져 있지 않다.

최근 프리온 질환의 신경세포 손실에 대한 산화적 스트레스 (oxidative stress)의 병인적 역할에 대해 활발한 연구가 진행되고 있다. 프리온 병원체에 감염된 동물의 뇌 조직에서 항산화효소의 일종인 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)의 활성저하와 그에 따른 미토콘드리아의 기능부전이 보고되었고 (4,14), 산화적 스트레스에 의한 지질과산화 (lipid peroxidation) 반응의 최종산물인 malondialdehyde (MDA) 및 hydroxynonenal (HNE)의 양이 증가하였음이 보고되었다 (13,24,26). 또한 마우스 뇌조직 및 배양 별아교세포 (astrocytes)에서 프리온 병원체에 의해 산화적 스트레스의 표지인자 (marker)인 heme oxygenase-1 (HO-1)의 유전자 발현이 증가 또는 유도됨이 보고되었다 (6,19). 이외에 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)의 생성량을 분석하였을 때, 대조군과 비교해서 프리온 병원체에 감염된 뇌조직에서 그 생성량이 현저하게 증가하였음이 보고되었다 (12,14). 이상의 보고들에서 프리온 질환의 발병기전에 산화적 스트레스가 밀접하게 관련되어 있음을 알 수 있다. 이들 보고들은 생화학적 또는 분자생물학적 분석방법에 의한 정량분석의 결과를 보여주고 있고, 면역염색방법을 사용한 최근의 논문 (1)에서도 병원성 프리온 단백질의 축적과의 관련성은 확인되지 않았다.

산화적 스트레스의 중요성은 그에 의해 체내의 단백질, 지질, 핵산과 같은 체내 분자들이 손상을 받게 되고, 손상 받은 분자들의 기능부전을 유발한다는 것이다 (9). 프리온 질환의 병리학적인 특징 중 한 가지는 별아교세포에 비정상 프리온 단백질이 축적한다는 것이다. 따라서 본 연구에서는 ME7 프리온 병원체에 의해 감염되었을 때 가장 손상받기 쉬운 뇌부위인 해마 (hippocampus)부위를

중심으로, 산화적 스트레스의 표지인자인 지질과산화 산물 (MDA, HNE)에 의해 수식된 단백질의 분포와 별아교세포에서의 비정상 프리온 단백질의 축적을 면역조직화학적 방법을 이용하여 분석함으로써 프리온 병원체와 산화적 스트레스 사이의 보다 직접적인 연관성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 프리온 strain

실험동물로는 생후 6~8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 사용하였고, 양의 scrapie에서 분리된 ME7 프리온 strain은 영국 Neuropathogenesis Unit의 Dr. Alan Dickinson 으로부터 제공받아 한림대학교 일송생명과학연구소에서 C57BL/6J 마우스에서 계대 배양하여 사용하였다. 사용된 동물실험 프로토콜은 한림대학교 실험동물윤리위원회의 승인을 받아서 수행하였다.

2. 프리온 병원체 감염

계대 배양에서 ME7 프리온 strain에 감염된 C57BL/6J 마우스 중 150일을 전후하여 병적증세가 나타나면 뇌를 적출하여, 뇌조직의 1/2은 10% 중성 formalin에 고정한 후 병리소견상 해면상 뇌증 (spongiform encephalopathy) 이 나타난 것을 확인한 후, 나머지 1/2의 뇌조직을 Ten Broeck tissue homogenizer (Wheaton, Millville, NJ, USA)를 이용하여 인산완충용액 (phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.4)으로 1% 균질액을 만들었다. 프리온 병원체 감염 군은 마우스를 전신마취 (sodium pentobarbital, 50 mg/kg body weight)한 후, stereotaxic apparatus (Stoelting, Wood Dale, IL, USA)를 이용한 microinjection 방법으로 상기에 서 제조한 1% 균질액을 30 μ l씩 대뇌피질에 감염시켰다. 대조군은 동일한 방법으로 정상 C57BL/6J 마우스의 1% 뇌조직 균질액을 동량 주입하였다. ME7 프리온 strain 감염 이후 운동실조 및 보행장애 등과 같은 병적증상이 나타나고 이러한 증상이 2주 이상 지속되는 150일을 전후하여 대조군 및 감염군의 동물을 희생시켜 본 실험에 사용하였다.

3. 항 체

HNE- 및 MDA-modified 단백질에 대한 마우스 단클론 항체는 일본 나고야대학의 Dr. Koji Uchida로부터 제공받

아 사용하였다 (20,25). PrP에 대한 항체로서 래빗 다클론-ME7 항체는 미국의 New York State Institute for Basic Research의 Dr. Kascsak으로 제공받았다 (10). 별아교세포의 glial fibrillary acidic protein (GFAP)에 특이적인 래빗 다클론-GFAP 항체는 Dako (Glostrup, Denmark)사의 제품을 사용하였다.

4. 뇌조직의 신경병리학적 관찰

대조군 및 감염군의 일부는 4% paraformaldehyde를 사용하여 심장을 통해 관류 고정시킨 후, 탈수과정을 거쳐 paraffin에 포매하였다. 그 후 rotary microtome (Reichert-Jung, Heidelberg, Germany)으로 6 μ m 두께로 절편을 제작하고, Hematoxylin-Eosin 및 Bodian과 periodic-acid Schiff (PAS) 이중염색 방법으로 염색하여 광학 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 해면상 퇴화 (spongiform encephalopathy)를 확인하였다.

5. 면역조직화학적 염색

상기의 관류 고정한 뇌조직의 일부는 면역조직화학적 염색을 위해서 polyester wax (Polyscience, Philadelphia, PA, USA)에 포매하여 절편을 제작하였다. 염색방법은 이전의 보고 (11)에서 사용한 것과 동일하고, ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용한 avidin-biotin-enzyme complex (ABC) 방법을 개량하여 실시하였다. 조직절편을 xylene 처리를 통해 wax를 제거하고 일련의 ethanol 용액을 사용하여 rehydration시켰다. 내인성 peroxidase 활성을 억제하기 위해서 1.4% H₂O₂/methanol 용액에 15분간 처리하였고, 이후 항체의 투과성을 높이기 위해 0.05% Triton X-100 용액에 15분간 침지한 후 PBS로 세척하였다. HNE-modified 단백질 및 MDA-modified 단백질의 염색을 위해서, 먼저 10% horse serum/PBS으로 실온에서 1시간 동안 blocking한 이후, HNE-modified 단백질 및 MDA-modified 단백질에 대한 항체를 각각 1:200으로 희석하여 4°C에서 14시간 동안 반응시켰다. 이후 biotinylated anti-mouse IgG (1:50)를 반응시킨 후 avidin-biotin peroxidase complex를 실온에서 2시간 처리하고, 3',3'-diaminobenzidine (DAB)/H₂O₂ 용액으로 1~5분간 발색시켰다. 이후 hematoxylin을 염색하였다.

HNE- 및 MDA-modified 단백질이 검출되는 세포의 확인 및 PrP^{Sc}의 축적과의 관련성을 알아보기 위해서 3 μ m의 연속절편을 사용하였고, GFAP 항체 및 ME7 PrP 항체

로 면역염색을 수행하였다. PrP^{Sc} 염색을 위해서는 1차 항체를 처리하기 전에 실온에서 7분간 proteinase K (10 μ g/ml)를 전처리하여 PrP^C를 제거한 후 실시하였고, 이후의 면역염색과정은 앞에서 서술한 것과 마찬가지로 ABC kit를 이용하였다.

결 과

대조군 및 감염군의 뇌조직에서 HNE- 및 MDA-modified 단백질에 대한 면역염색 및 연속절편 염색결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대조군의 경우 HNE- 및 MDA-modified 단백질의 면역반응성은 검출되지 않은 반면 (Fig. 1A, E). 감염군의 경우 다수의 공포 (vacuolation)와 함께 강한 면역반응성이 검출되었다 (Fig. 1C, G). 이들의 면역반응성은 세포의 형태를 기준으로 보았을 때 다수의 별아교세포와 일부 신경세포에서 검출된 것으로 판단되었다. 이를 확인하고자, 연속절편을 사용해서 별아교세포에 특이적인 GFAP에 대한 항체로 면역염색을 실시하였다. Fig. 1D와 H에 나타내었듯이 감염군에서 강한 GFAP-면역반응성이 검출됨으로써 별아교세포의 활성화가 관찰되었다. 이들의 면역반응성을 HNE- 및 MDA-modified 단백질의 면역염색결과 (Fig. 1C, G)와 각각 비교하였을 때, 동일한 세포에서 검출되는 것을 알 수 있고, 이는 HNE- 및 MDA-modified 단백질의 대부분이 별아교세포에서 축적되는 것을 의미한다. 반면, 대조군에서는 약한 GFAP-면역반응성만이 관찰되었다 (Fig. 1B, F).

Fig. 1에서 검출된 HNE- 및 MDA-modified 단백질들의 생성과 프리온 병원체 감염에 의한 PrP^{Sc}의 축적과의 관련성을 알아보기 위해서, 연속절편을 사용하여 면역염색을 실시하였다. Fig. 2에 나타내었듯이, 감염군의 뇌조직에서 PrP^{Sc}의 강한 면역반응성이 관찰됨으로써 PrP^{Sc}가 축적됨을 확인하였고, 형태학적 특징에서 별아교세포인 것으로 판단되었다 (Fig. 2B, D). 이들의 연속절편을 사용하여 HNE- 및 MDA-modified 단백질에 대해서 면역염색을 실시한 결과, Fig. 2B, D에서 관찰된 PrP^{Sc} 양성세포들과 정확하게 일치하는 것으로 확인되었다 (Fig. 2A, C). 이러한 결과는 PrP^{Sc}가 축적되는 별아교세포에 HNE- 및 MDA-modified 단백질들이 생성되는 것을 나타내고, 이는 PrP^{Sc}에 의한 산화적 스트레스가 별아교세포에 존재함을 의미하는 것으로 판단되었다.

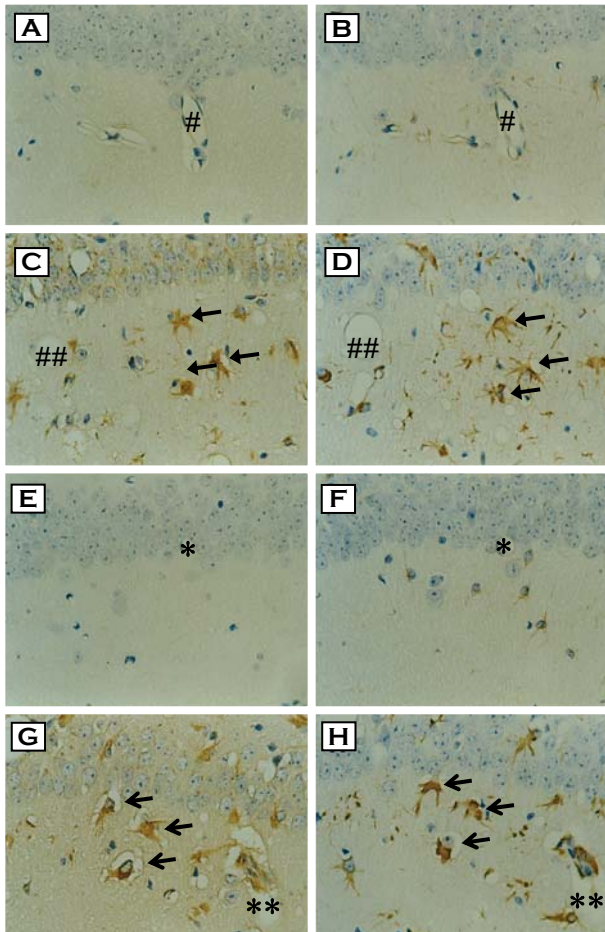


Figure 1. Immunohistochemical staining and cellular localizations of HNE- and MDA-modified proteins in the hippocampus of ME7 prion-infected mice. Brain sections from control (A & E) and ME7-infected mice (C & G) were immunostained with either anti-HNE-modified protein (A & C) or anti-MDA-modified protein antibody (E & F). Intense immunoreactivities of HNE- and MDA-modified proteins were observed in the infected group (C & G, respectively; arrows). Each serial section was also immunostained with anti-GFAP antibody (B, D, F & H) to examine the cellular localization of HNE- and MDA-modified proteins. HNE- and MDA-modified protein-positive cells were co-localized with GFAP-positive astrocytes (C vs. D, G vs. H, respectively; arrows). Each symbol (#, ##, *, **) indicates landmark blood vessel in adjacent section (A & B, C & D, E & F, G & H, respectively). $\times 400$.

고 찰

프리온 질환에 걸린 개체의 대표적인 특징은 중추신경계의 미세아교세포 (microglia) 및 별아교세포 (astrocytes)의 활성화가 일어난다는 것이다 (21,22,23). 이들 아교세포의 활성화는 병원체에 감염된 이후 관찰되는 PrP^{Sc}의 축적시기 뿐만 아니라 그 분포와도 밀접하게 관련되어

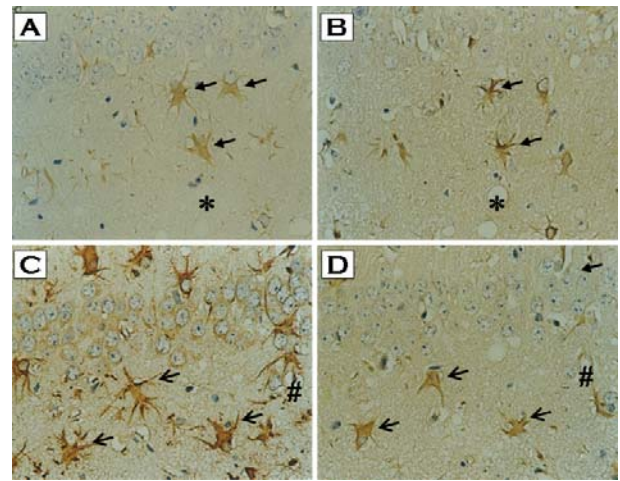


Figure 2. Co-localization of PrP^{Sc} with either HNE- or MDA-modified proteins in the hippocampus of ME7 prion-infected mice. Brain sections from ME7-infected mice were immunostained with either anti-HNE-modified protein (A), anti-MDA-modified protein (C), or anti-PrP antibody (B & D). Immunoreactivities of HNE-modified protein as well as MDA-modified protein were co-localized with PrP^{Sc}-positive astrocytes (A vs. B, C vs. D, respectively; arrows). Each symbol (*, #) indicates landmark blood vessel in adjacent section (A & B, C & D, respectively). $\times 400$.

있다. 이러한 관찰에서 연구자들에 따라 미세아교세포 또는 별아교세포가 신경세포 이외의 PrP^{Sc}의 증식이 직접적으로 일어나는 세포로 판단하고 있다 (7,15,21). 이들 아교세포의 활성화와 함께 사이토카인 등을 포함하는 여러 가지 염증성 매개체들이 생성되는 것이 보고되었지만 (3,22,23), 이러한 반응이 신경세포의 소실에 방어적으로 작용하는지 또는 유도하는 역할을 하는 것인지에 대해서는 분명하지 않다. 최근, 마우스의 배양 소뇌절편 (cerebellar slice)을 이용한 프리온 병원체 감염실험에서, 미세아교세포를 약물유전학적으로 제거해 주었을 때 PrP^{Sc}의 증식이 증가하고 병원체에 대한 감수성이 증가하는 것으로 확인되었다 (8). 이 결과는 프리온 질환의 발병에 있어 미세아교세포의 활성화는 PrP^{Sc}를 제거해 줌으로써 신경보호적으로 작용한다는 것을 의미한다. 반면, 별아교세포의 경우 세포의 활성화는 프리온 질환의 초기에 일어나고 신경세포의 소실이 일어나기 이전에 나타난다 (3,7). 또한 PrP^{Sc}의 축적은 프리온 질환의 신경병리학적 변화가 관찰되기 이전에 별아교세포에서 일어나는 것으로 보고되었다 (7). 이외에 프리온 병원체에 저항성을 가지는 PrP 유전자 결손 (PrP-knockout) 마우스를 이용한 실험에서, 별아교세포에만 특이적으로 프리온 단백을 발현하도록 했을 때 병원체에 대해 감수성을 가지

게 되는 것으로 보고되었다 (18). 이들의 결과는, 별아교세포에의 PrP^{Sc} 축적에 의해 별아교세포 활성화가 유발되고, 이러한 과정이 질환의 발병에 밀접하게 관련하고 있음을 의미한다.

본 실험에서는 프리온 병원체 감염에 의해 HNE- 및 MDA-modified 단백질이 증가하고, 이러한 증가는 PrP^{Sc}가 축적되는 별아교세포에서 관찰됨으로써 PrP^{Sc}의 축적과 밀접하게 관련하고 있음을 확인하였다. 프리온 병원체 감염에 의해 활성산소종에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있는 전사인자인 nuclear factor kappa-B의 증가가 별아교세포에서 나타난다는 것이 보고되었다 (12). 또한 PrP^{Sc}의 amino-말단 부분에 무효소 당화 반응산물이 형성됨이 확인되었고, 이들의 면역반응성 또한 프리온 병원체 감염동물의 별아교세포에서 관찰되었다 (5). 이들의 결과는 PrP^{Sc}의 축적에 의해 별아교세포에서 과도한 산화적 스트레스가 유발되고 결과적으로 지질과산화산물의 축적이 일어날 것임을 나타낸다. 이러한 지질과산화물 축적이 신경세포의 지지 또는 보호하는 역할을 하는 별아교세포 본연의 기능에 어떠한 영향을 미치는지, 또한 PrP^{Sc}의 증식 또는 형성과정에 산화적 스트레스가 어떠한 관련이 있는지 향후 연구되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Andreoletti O, Levavasseur E, Uro-Coste E, Tabouret G, Sarradin P, Delisle MB, Berthon P, Salvayre R, Schelcher F, Negre-Salvayre A: Astrocytes accumulate 4-hydroxynonenal adducts in murine scrapie and human Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* **11**: 386-393, 2002.
- 2) Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB: Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311, 1982.
- 3) Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV: Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* **68**: 2383-2387, 1994.
- 4) Choi SI, Ju WK, Choi EK, Kim J, Lea HZ, Carp RI, Wisniewski HM, Kim YS: Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263K scrapie agent. *Acta Neuropathol* **96**: 279-286, 1998.
- 5) Choi YG, Kim JI, Jeon YC, Park SJ, Choi EK, Rubenstein R, Kascak RJ, Carp RI, Kim YS: Nonenzymatic glycation at the N terminus of pathogenic prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem* **279**: 30402-30409, 2004.
- 6) Choi YG, Kim JI, Lee HP, Jin JK, Choi EK, Carp RI, Kim YS: Induction of heme oxygenase-1 in the brains of scrapie-infected mice. *Neurosci Lett* **289**: 173-176, 2000.
- 7) Diedrich JF, Bendheim PE, Kim YS, Carp RI, Haase AT: Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 375-379, 1991.
- 8) Falsig J, Julius C, Margalith I, Schwarz P, Heppner FL, Aguzzi A: A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nat Neurosci* **11**: 109-117, 2008.
- 9) Halliwell B: Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**: 1609-1623, 1992.
- 10) Kascak RJ, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Rubenstein R, Carp RI, Powers JM: The role of antibodies to PrP in the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand* **80**: 141-151, 1993.
- 11) Kim JI, Jin JK, Choi EK, Spinner D, Rubenstein R, Carp RI, Kim YS: Increased expression and localization of cyclooxygenase-2 in astrocytes of scrapie-infected mice. *J Neuroimmunol* **187**: 74-82, 2007.
- 12) Kim JI, Ju WK, Choi JH, Choi E, Carp RI, Wisniewski HM, Kim YS: Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res Mol Brain Res* **73**: 17-27, 1999.
- 13) Kim NH, Park SJ, Jin JK, Kwon MS, Choi EK, Carp RI, Kim YS: Increased ferric iron content and iron-induced oxidative stress in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res* **884**: 98-103, 2000.
- 14) Lee DW, Sohn HO, Lim HB, Lee YG, Kim YS, Carp RI, Wisniewski HM: Alteration of free radical metabolism in the brain of mice infected with scrapie agent. *Free Radic Res* **30**: 499-507, 1999.
- 15) Manuelidis L, Fritch W, Xi YG: Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* **277**: 94-98, 1997.
- 16) Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10962-10966, 1993.
- 17) Prusiner SB: prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13363

- 13383, 1998.
- 18) **Raeber AJ, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A, Bessen RA, Mucke L, Manson J, Aguzzi A, Oldstone MB, Weissmann C, Chesebro B:** Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J* **16**: 6057-6065, 1997.
 - 19) **Rizzardini M, Chiesa R, Angeretti N, Lucca E, Salmona M, Forloni G, Cantoni L:** Prion protein fragment 106-126 differentially induces heme oxygenase-1 mRNA in cultured neurons and astroglial cells. *J Neurochem* **68**: 715-720, 1997.
 - 20) **Toyoda K, Nagae R, Akagawa M, Ishino K, Shibata T, Ito S, Shibata N, Yamamoto T, Kobayashi M, Takasaki Y, Matsuda T, Uchida K:** Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal: an endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *J Biol Chem* **282**: 25769-25778, 2007.
 - 21) **Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M:** PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* **144**: 433-438, 1997.
 - 22) **Williams A, van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H:** Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res* **754**: 171-180, 1997.
 - 23) **Williams AE, van Dam AM, Man-A-Hing WK, Berkenbosch F, Eikelenboom P, Fraser H:** Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res* **654**: 200-206, 1994.
 - 24) **Wong BS, Brown DR, Pan T, Whiteman M, Liu T, Bu X, Li R, Gambetti P, Olesik J, Rubenstein R, Sy MS:** Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *J Neurochem* **79**: 689-698, 2001.
 - 25) **Yamada S, Kumazawa S, Ishii T, Nakayama T, Itakura K, Shibata N, Kobayashi M, Sakai K, Osawa T, Uchida K:** Immunochemical detection of a lipofuscin-like fluorophore derived from malondialdehyde and lysine. *J Lipid Res* **42**: 1187-1196, 2001.
 - 26) **Yun SW, Gerlach M, Riederer P, Klein MA:** Oxidative stress in the brain at early preclinical stages of mouse scrapie. *Exp Neurol* **201**: 90-98, 2006.
-