

특발성 황반원공에서 유리체 단백질 발현에 관한 분석

이광훈¹ · 안재균²

밝은안과²¹, 삼성안과이비인후과²

목적: 황반원공의 유리체 단백질 발현양상을 정상안 및 황반전막과 비교하여 그 차이를 알아보았다.

대상과 방법: 정상안 10안, 유리체황반건인증후군 4안, 황반원공 25안(후유리체박리가 없는 15안과 있는 10안), 후유리체박리가 있는 황반전막 10안에서 유리체를 얻어 micro-RPLC-MS/MS 기법으로 단백질을 정성적으로 분석하였다. 확인된 단백질의 기능적 분류, 조직에서 위치 및 조직 특이성을 조사하였다.

결과: 총 단백질 농도는 후유리체박리가 없는 황반원공에서 가장 높았다($p < 0.01$). 정상안에서 나이에 따른 유리체 단백질 발현의 차이는 발견되지 않았지만 보고된 적 없는 12개(vasorin 등)의 새로운 단백질을 정상안 유리체에서 발견하였다. 총 136개 단백질 중 10개(retinoschisin 등, 7.3%)가 황반원공에서만 특이적으로 발현되었다. 후유리체박리가 없는 안에서 특이적으로 발현된 단백질은 S100A8 등 6개였고 후유리체박리가 있는 안에서 특이적으로 발현되는 단백질은 CD59 등 6개였다.

결론: 황반원공의 유리체 단백질 발현은 정상안과 황반전막과 비교하여 미세한 차이가 있었고 후유리체박리 유무와 유의한 관련이 있었다.

〈대한안과학회지 2012;53(10):1512-1522〉

유리체는 98% 가량 수분으로 이루어진 세포성분이 거의 없는 세포외기질로 이루어진 조직이다. 유리체의 구조를 이루는 주요한 성분은 여러 콜라겐(II, V, VI, IX, XI)들과 히알루로난의 뼈대로 이루어져 있다. 이러한 겔(gel)조직을 유지하는 유리체가 노화현상으로 인하여 유리체 중심부로부터 콜라겐들이 응집되며 히알루로난 성분이 모여 액화(liquefaction)되는 현상이 발생한 후 작은 공포를 형성하고 여러 개의 공포들이 합쳐져 하나의 공포가 만들어진 후 후유리체가 망막으로부터 떨어지는 후유리체박리(posterior vitreous detachment, PVD)가 일어나게 된다.¹ 어떤 이유로 유리체 액화현상이 진행하여 후유리체박리가 유발되는지에 대해 아직까지 잘 알려진 바가 없다. 유리체는 기본적으로 세포성분이 거의 없는 조직이지만 탐식작용을 가진 단핵구 계열의 유리체세포(hyalocyte), 대식세포(macrophage), 섬유아세포(fibroblast)와 유사한 세포들이 유리체피질과 유리체 기저부에 존재한다.^{2,3} 유리체세포는 S100 단백질을 발현하고 CD68은 발현하지 않아 다른 조직의 대식세포와 다른 양상을 보이지만 유리체에서 어떤 기능을 하는지 명

확하지 않다.² 이러한 유리체세포가 어떤 이유로든 활성화되고 유리체 기저부로 이동함에 따라 유리체 피질이 구조적으로 변형되어 유리체 중심부의 액화된 유리체가 유리체 피질의 구멍을 통해 유입되면 후유리체박리가 시작된다.⁴ 후유리체박리는 특발성 황반원공(idiopathic macular hole, MH)과 유리체황반건인증후군(vitreomacular traction syndrome, VMTS), 특발성 황반전막(idiopathic epiretinal membrane, ERM)과 모두 밀접하게 관련되어 있다고 알려졌다.⁵⁻⁷

특발성 황반원공의 병리기전을 이해하고 새로운 치료제 개발에 근거가 되는 생체지표(biomarker)를 찾기 위해 사람 눈에서 유리체 단백질 발현에 관한 database가 필요하다. 고전적인 2-D 전기영동을 이용한 단백질 분석기법은 단백질의 동적인 변화가 제한되고 예민도가 낮아 유리체 단백질을 자세히 분석하는 데 한계가 있었다.⁸ 최근 RPLC-MS/MS 분석기법의 발달로 다양한 단백질 혼합체에서 동적인 변화량과 측정 예민도가 높아져 미량의 시료에도 많은 단백질 발현의 성상을 알 수 있게 되었다.^{9,10} 특히 사람에게서 얻어지는 유리체는 주위 조직에서 분비하는 단백질 양이 적고 시료의 양도 충분치 않아 2-D 전기영동을 이용하기보다 높은 예민도를 가진 RPLC-MS/MS 기법을 사용하는 것이 유용하다. 이러한 기법을 사용하면 최소 10-100 pg/ml의 농도까지 측정 가능하여 대단위의 단백질 자료를 얻을 수 있다. 이러한 기법을 이용한 유리체 단백질 분석은 당뇨망막병증에서 주로 이루어져 왔고 후유

■ 접수 일: 2012년 2월 17일 ■ 심사통과일: 2012년 7월 1일
■ 게재허가일: 2012년 8월 25일

■ 책임저자: 안재균

전북 전주시 완산구 우전로 225
삼성안과이비인후과
Tel: 063-220-0114, Fax: 063-220-0100
E-mail: Oph20@freechal.com

Table 1. Demographic features of enrolled patients

Variables	Donor eye (n = 10)	VMTS (n = 4)	MH, PVD (-) (n = 15)	MH, PVD (+) (n = 10)	ERM (n = 10)
Age (yr)	40 ± 15	56 ± 11	65 ± 6	67 ± 5	64 ± 10
Gender (M/F)	7/3	3/1	6/9	5/5	3/7

Values are presented as mean ± SD or number.

VMTS = vitreomacular traction syndrome; MH = macular hole; PVD = posterior vitreous detachment; ERM = epiretinal membrane.

리체박리에 따른 유리체 단백질의 변화와 특발성 황반원공에 특이적인 유리체 단백질의 정성적 분석은 아직까지 보고된 바 없다.¹¹⁻¹³ 더욱이 정상안에서 나이에 따른 유리체 단백질 성상에 대한 연구도 보고된 바 없다. 본 연구의 목적은 특발성 황반원공 환자들의 유리체 단백질 발현을 분석하여 정상안과 황반전막환자들과 비교하여 유리체 단백질 발현에 차이가 있는지를 알아보고 황반원공 발생 이전 단계인 유리체황반견인증후군과 특발성 황반전막 환자들의 유리체 단백질 발현과 비교하여 후유리체박리로 인한 황반에 대한 유리체견인 유무에 따른 유리체 단백질 발현의 정성적인 차이를 알아보고자 하였다. 또한 사후기증안을 이용하여 정상안에서 나이에 따른 유리체 단백질 발현의 정성적인 차이가 있는지 알아보고자 하였다.

대상과 방법

대상군과 유리체 채취방법

기존 안질환이 없고 안구적출 후 6시간 이내의 사후 기증안 10안을 전남대학교 안은행에서 얻었다. 각막 적출 전 통상적인 유리체절제술과 같은 경로인 모양체 평면부를 경유하여 유리체절제기를 이용하여 유리체를 채취하였다. 수술 현미경을 보면서 20게이지 공막절개창을 만들고 희석되지 않은 유리체를 유리체절제기의 흡입라인에 1 ml 주사기를 연결해서 1.0 ml 유리체를 얻었다. 2008년 1월부터 2009년 12월까지 특발성 황반원공 환자 25안(후유리체박리가 없는 15안과 후유리체박리가 있는 10안), 후유리체박리가 있는 특발성 황반전막 환자 10안, 유리체황반견인증후군 환자 4안으로부터 사후 기증안에서 얻는 방법과 동일하게 통상적인 유리체절제술 직전에 0.5-0.8 ml 희석되지 않은 유리체를 채취하였다. 채취된 유리체는 Eppendorf tube에 넣어 15분간 12,000 rpm으로 원심분리 후 세포성분이 없는 상층액만 채취하여 -80°C에 보관한 후 한꺼번에 같이 분석하였다.

유리체황반견인증후군, 특발성 황반원공, 특발성 황반전막의 진단과 후유리체박리여부는 빛간섭단층촬영(optical

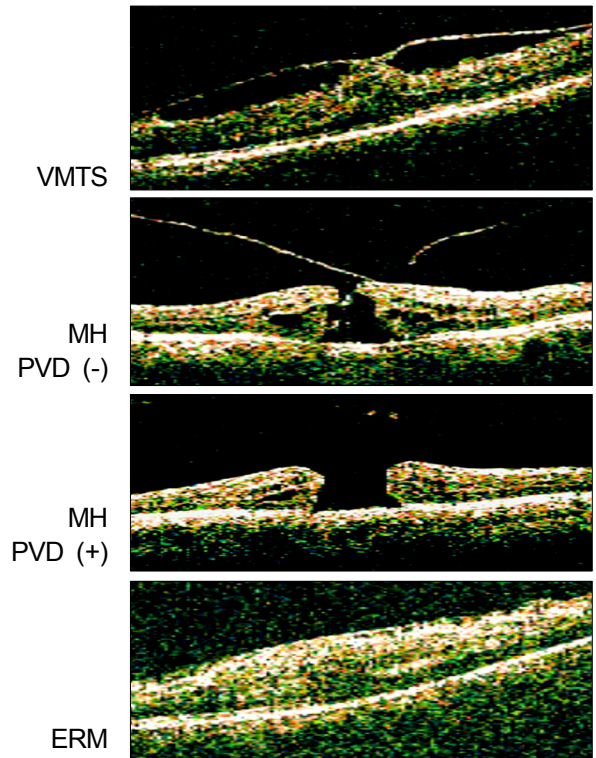


Figure 1. Classification of patients based on the features of optical coherence tomography (OCT). VMTS = vitreomacular traction syndrome; MH = macular hole; PVD = posterior vitreous detachment; ERM = epiretinal membrane.

coherence tomography)을 이용하여 확인하였다(Fig. 1). 후유리체박리가 있는 황반원공 환자들은 최소 6개월 이상의 시력소실이 있던 환자들만 포함하였다. 이전 안외상, 나이관련황반변성, 당뇨병, 안구내 수술 및 포도막염 병력이 있던 환자들은 제외하였다. 환자들의 인구학적 특성은 Table 1에 기술하였다(Table 1).

단백질 추출과 용해

채취된 유리체를 tri-chloroacetic acid(TCA)-acetone 방법을 이용하여 침전시켰다. TCA stock 용액(100%, 4°C)을 천천히 200 µl 가량 유리체 샘플에 넣어 최종농도가 20%가 되도록 한 후 원심분리를 해서 모은 다음 ice-cold acetone에 두 번 세척하였다. 단백질 침전물은 8M urea,

100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM DTT 용액을 이용하여 녹인 후 BCA assay (Pierce biotechnology, CA, USA) 기계를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 군 간의 단백질 농도의 비교는 Mann-Whitney *U* test를 이용하여 비교하였다. 단백질 내에 disulfide 결합을 제거하기 위해 5 mM DTT 용액에서 37°C에서 30분간 반응시킨 후 암실에서 25 mM IAA로 30분간 반응시켰다. 얻어진 단백질 용액을 2 M urea와 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액에 돼지 트립신(Promega, CA, USA)을 1:50 (효소:기질)의 비율로 5 mM CaCl₂를 첨가하여 12시간 동안 단백질을 녹여 펩타이드로 분리하였고 5% formic acid를 첨가해서 효소반응을 정지시킨 후 -80°C에 모두 보관하여 함께 분석하였다.

Micro RPLC-MS/MS 분석

8 cm 길이의 5 µm 입자 크기를 가지고 있는 AQUA C-18 column material (Metachem, Ventura, CA, USA)를 함유한 silica capillary columns (100 micron *i.d.*, 360 micron *o.d.*)에 용해된 펩타이드 샘플을 로딩하였다. 샘플 로딩된 칼럼을 Agilent HP1100 quaternary LC pump에 위치시킨 후 splitter system을 이용하여 분당 250 nl의 flow로 흐르게 하였다. 버퍼 A 용액(5% acetonitrile and 0.1% formic acid)과 버퍼 B (80% acetonitrile and 0.1% formic acid) 용액을 이용하여 110분 가량 펩타이드 이동 시간이 걸리는 농도 차이를 만들었다. 각 펩타이드들의 이동은 농도 차이의 프로필에 의해 100% buffer A에서 5분, 0% to 55% buffer B에서 70분, 55% to 100% buffer B에서 30분, 마지막으로 100% buffer B에서 5분을 통과하도록 하였고 방출된 peptides들은 LTQ Ion Trap Mass spectrometer (ThermoFinnigan, Palo Alto, CA; 2.3 kV of DC voltage) 기계를 이용하여 전기적으로 직접 뿌려진 후 각각의 방출된 peptides들은 full MS scan (400-1400 m/z) 하나와 열 개의 data-dependent MS/MS scans으로 이루어져 최종적으로 MS/MS spectra를 만들어 냈다.

질량분석기(mass spectrometry)를 이용한 분석

각 MS/MS spectra들은 SEQUEST (V.3.4., Sage-N re-search, CA, USA) 프로그램을 이용하여 IPI human protein database (v.3.43, downloaded in July, 2008)에서 해당하는 단백질을 찾았고 Scaffold (version Scaffold-01_07_00, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA)를 이용하여 MS/MS based 펩타이드와 해당 단백질을 확인하였다. 각각의 단백질들은 spectral counting로 단백질의 protein abundance를 평가하였고 해당 단백질의 기능적 분류, 조직 내 위치 및 조직특이성에 대해 IPI accession numbers를 Uniprot database (<http://www.uniprot.org>)를 통해 확인하여 분류하였다. 사후 기증안에서 30세와 60세를 기준으로 3군으로 나누어 유리체 단백질 발현 양상을 비교하였다. 그리고 정상안, 황반원공과 황반전막의 3군의 유리체 단백질 발현의 차이점을 분석하였고 후유리체박리 여부에 따라 유리체황반견인증후군, 후유리체박리가 없는 황반원공, 후유리체박리가 있는 황반원공 및 황반전막에서 유리체 단백질의 성상의 다른 점을 조사하였다.

결 과

정상안에서 유리체 단백질 발현 양상

정상안에서 나이에 따른 유리체 단백질 발현의 전체적인 양상을 Table 2에 기술하였다(Table 2). 나이에 따른 유리체 단백질 농도나 단백질 개수 및 단백질의 발현 정성적인 차이는 없었다. 확인된 단백질의 세포내 위치나 조직특이성의 비율에도 차이가 없었다. 저자는 본 연구에서 micro-RPLC/MS/MS 기법으로 확인된 적 없는 12개 (oligodendrocyte-myelin glycoprotein, cartilage-acidic protein 1, semaphorin 7A, testican-1, collagen VIA2, collagen IXA2, secretogranin-3, gamma enolase 2, TGF-beta binding protein 2, vasorin, dermcidin 및 chondromodulin-1)의 새로운 단백질을 정상안 유리체에

Table 2. Comparison of vitreous proteomes in donor eyes according to the ages

	Young age (<30 yr) (n = 4)	Middle age (30-60) (n = 3)	Old age (>60 yr) (n = 3)
Protein concentrations (µg/µl)	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.08	0.29 ± 0.06
Proteins counts (n)	129 ± 21	121 ± 6	122 ± 13
Subcellular locations (IC/EC/Mem, %)	5/82/17	6/84/10	7/85/8
Tissue specificity (brain/eye/cartilage, n)	15/6/4	15/6/4	15/6/4
Protein abundance (high/medium/low, n)	32/38/52	34/33/53	35/37/51

Values are presented as mean ± SD unless otherwise indicated.

IC = intracellular; EC = extracellular; Mem = cell membrane.

Table 3. Vitreous proteins newly identified in donor eyes by micro-RPLC-MS/MS

IPI	Gene	Protein name	SC	Location	Function	Tissue specificity/disease
IPI00295832	OMG	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein	2 ± 1	Mem	Adhesion	CNS
IPI00451624	CRTAC1	Cartilage acidic protein 1	3 ± 2	EC	Adhesion	Cartilage
IPI00025257	SEMA7A	Semaphorin-7A	4 ± 1	Mem	Differentiation	CNS
IPI00005292	SPOCK1	Testican 1	4 ± 2	EC	Adhesion	CNS
IPI00291636	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	2 ± 1	EC	Adhesion	Myopathy
IPI00019088	COL9A2	Collagen alpha-2(IX) chain	2 ± 1	EC	Structure	Cartilage/vitreous
IPI00292071	SCG3	Secretogranin-3	2 ± 1	EC	NA	Neuroendocrine
IPI00216171	ENO2	Gamma-enolase	11 ± 5	Mem	Metabolism	CNS
IPI00027547	DCD	Dermcidin	7 ± 4	EC	Anti-microbial	Sweat gland
IPI00292150	LTBP2	TGF-beta binding protein 2	2 ± 1	EC	TGF signalling	CNS/glaucoma
IPI00395488	VASN	Vasorin	2 ± 1	Mem	TGF inhibition	Aorta
IPI00027162	LECT1	Chondromodulin 1	8 ± 3	EC	Differentiation	Cartilage

SC = spectrum counts; Mem = cell membrane; CNS = central nervous system; EC = extracellular; NA = not applicable.

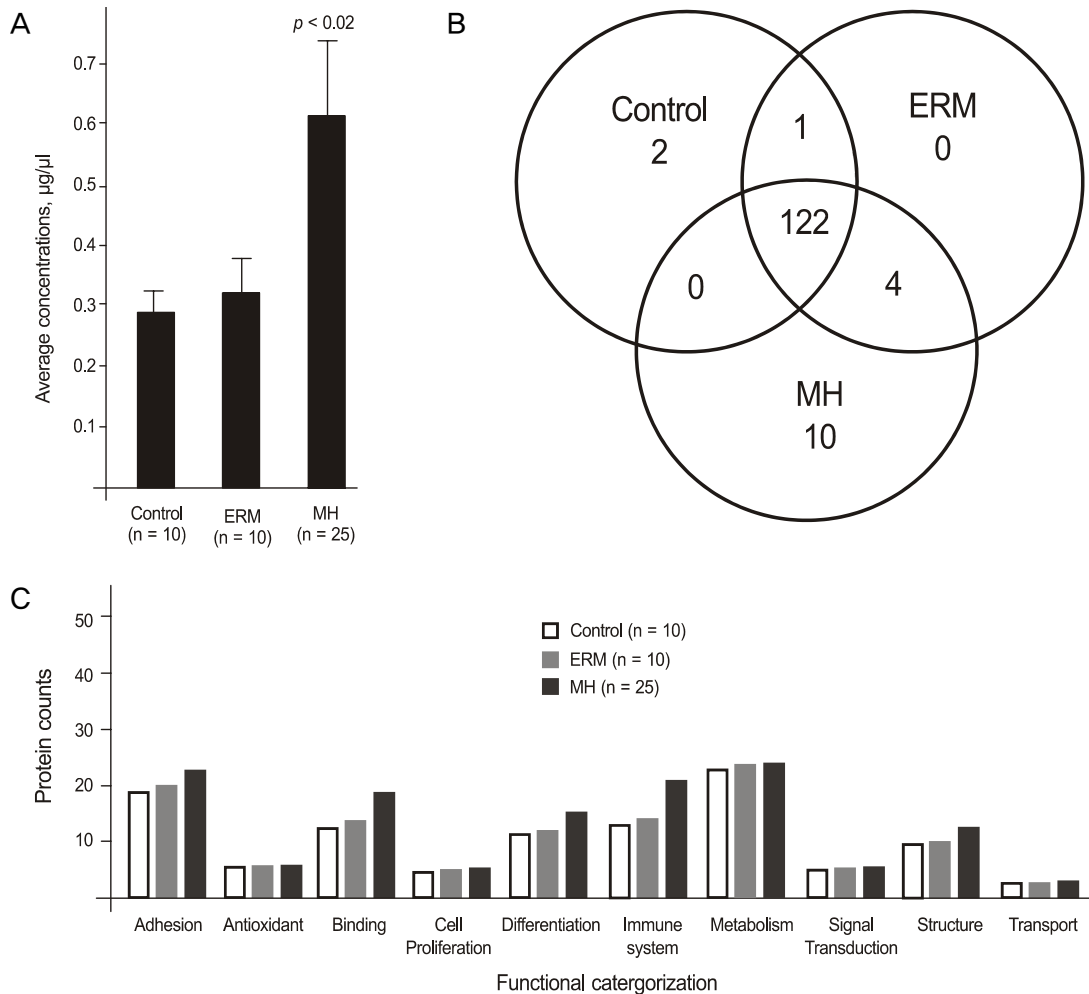


Figure 2. Comparison of vitreous proteomes among donor eyes, macular hole (MH) samples and epiretinal membrane (ERM) samples. (A) Average protein concentrations in vitreous. (B) Venn diagram of proteins identified from the control (donor eye), MH and ERM samples. (C) Function categorizations of vitreous proteins identified.

서 발현됨을 확인하였다(Table 3). 12개 단백질들 중 중추 신경계에 조직특이성을 보이는 5개의 단백질들은 oligoden-

drocyte-myelin glycoprotein (OMG), semaphorin-7A, testican-1, TGF-beta binding protein 2, gamma enolase

2였고 연골에 조직특이성을 보이는 cartilage-acidic protein 1, collagen IX A2, chondromodulin-1 들이었다. 새롭게 확인된 4개의 단백질들(OMG, semaphorin-7A, cartilage-acidic protein 1, collagen IX A2)은 세포부착과 관련된 기능을 하는 것이었고, 2개의 단백질들(testican-1, chondromodulin-1)은 세포분화와 관련 작용을 하는 것이었고, TGF-beta 신호체계와 관련된 단백질이 2개였다.

특발성 황반원공에서 유리체 단백질 발현 양상

유리체 평균 단백질 농도는 정상안(10안)과 황반전막(10안)보다 황반원공(25안)에서 통계적으로 유의하게 가장 높았다($0.28 \pm 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.34 \pm 0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vs. $0.64 \pm 0.26 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $p=0.02$, Mann-Whitney U test) (Fig. 2A). 총 단백질의 개수는 정상안에서 125개 황반전막에서 127개 황반원공에서 136개가 확인되었다(Fig. 2B). 그중 122개의 단백질은 세 군에서 공통으로 발현되었고 총 14개의 단백질이 정상안에서는 발견되지 않고 황반원공과 황반전막에서만 발현되었다. 전체 단백질들에 대한 기능적 분류를 해서 정상안과 비교한 경우 황반원공과 황반전막에서 통계적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다(Fig. 2C). 그러나 황반원공에서 정상안과 황반전막에 비해 세포부착, 세포분화 및 면역체계 관련 단백질들의 발현이 증가하는 경향을 보였다. 정상안과 비교해 볼 때 136개의 단백질 중 10개(7.3%)의 단백질들은 황반원공에서만 발견되었고 4개의 단백질들은 황반전막과 황반원공에서 공통적으로 발현되었다(Table 4). 황반원공에서만 발현되는 단백질은 S100A7,

A8, A9, CD59, retinoschisin, semenogelin-1, heat shock protein beta-1, Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1, palladin, peroxiredoxin 2이었다. 황반원공과 황반전막에서만 발현된 단백질은 filaggrin-2, galectin-3-binding protein, astrotactin-2과 tolloid-like protein 2였다. 황반원공에서만 확인된 단백질들은 급성이나 만성 염증조직에서 발현되는 면역기능과 관련된 것과 망막조직의 구조를 유지하는 기능을 하는 것들이었다. 또한 중추신경계에서 세포 스트레스 상황에서 세포보호와 세포이동과 관련된 단백질들이 황반원공에서만 발견되었다.

후유리체박리 유무에 따른 유리체 단백질 발현의 분석

유리체 평균 단백질 농도는 정상안 10안에서 $0.28 \pm 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 후유리체박리가 있는 20안(황반전막 10안, 황반원공 10안)에서 $0.32 \pm 0.08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이었고 후유리체박리가 없는 19안(황반원공 15안, 유리체황반견인증후군 4안)에서 $0.79 \pm 0.14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 나머지 두 군에 비해 통계적으로 유의하게 가장 높았다($p<0.01$, Mann-Whitney U test) (Fig. 3A). 정상안을 제외하고 실제 환자 39명의 유리체 단백질 발현을 분석해보면 후유리체박리에 상관없이 총 130개의 단백질은 공통적으로 발현되는 것으로 확인하였고 후유리체박리가 없는 안에서만 발현되는 단백질은 6개(4.4%)였고 후유리체박리가 있는 안에서만 발현되는 단백질은 6개였다(Fig. 3B). 후유리체박리가 없는 안에서 특이적으로 발현된 단백질은 S100A7, A8, A9, retinoschisin, semenogelin-1과 palladin이었고 후유리체박

Table 4. Different profiles of vitreous proteins identified by micro-RPLC-LC-MS/MS in donor eye, epiretinal membrane and macular hole samples

IPI	Gene	Protein name	SC	Location	Function	Tissue specificity
Exclusively detected in macular hole samples						
IPI00219806	S100A7	Protein S100-A7	2 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00007047	S100A8	Protein S100-A8	2 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00027462	S100A9	Protein S100-A9	3 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00011302	CD59	CD59	2 ± 1	EC	Immunity	NA
IPI00007331	RS1	Retinoschisin	3 ± 1	EC	Structure	Retina
IPI00023020	SEMG1	Semenogelin 1	7 ± 5	EC	Structure	Seminal vesicle
IPI00025512	HSPB1	Heat shock protein beta 1	2 ± 1	IC	Stress response	CNS
IPI00022077	WASF1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1	2 ± 1	IC	Binding	CNS
IPI00856046	PALLD	Palladin	2 ± 1	IC	Cytoskeleton	NA
IPI00027350	PRDX2	Peroxiredoxin 2	2 ± 1	IC	Antioxidant	NA
Exclusively detected in epiretinal membrane and macular hole samples						
IPI00465231	TLL2	Tolloid-like protein 2	2 ± 1	EC	Differentiation	NA
IPI00397801	FGL2	Filaggrin-2	2 ± 1	NA	Binding	NA
IPI00023673	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	8 ± 3	EC	Adhesion	NA
IPI00413773	ASTN2	Astrotactin-2	2	EC	NA	NA

SC = spectrum counts; EC = extracellular; NA = not applicable; IC = intracellular; CNS = central nervous system.

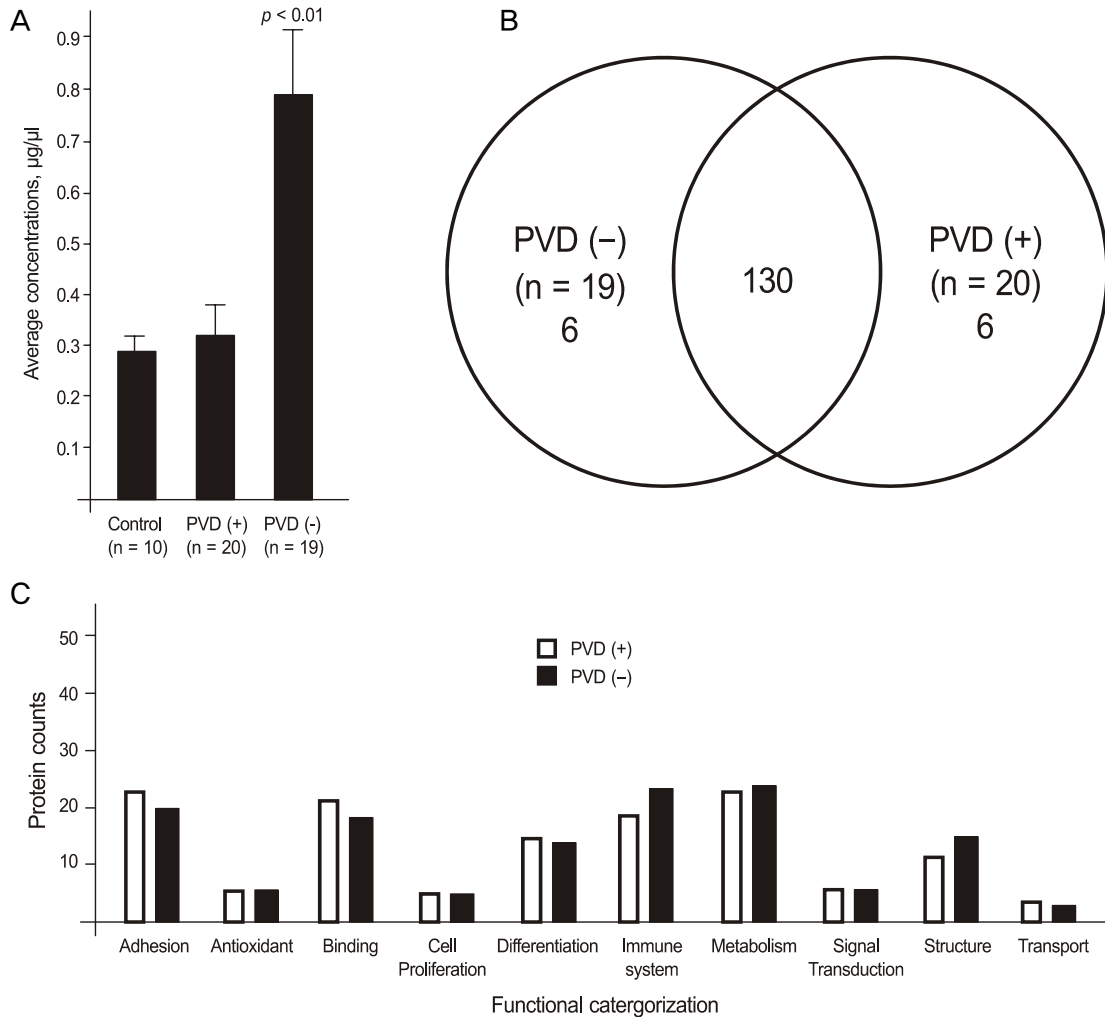


Figure 3. Comparison of vitreous proteomes according to the presence of posterior vitreous detachment (PVD). (A) Average protein concentrations in vitreous. (B) Venn diagram of proteins identified based on the status of PVD. (C) Function categorizations of vitreous proteins identified.

리가 있는 안에서 특이적으로 발현되는 단백질은 tolloid-like protein 2, filaggrin-2, galectin-3-binding protein, CD59, peroxiredoxin 2와 TGF-beta binding protein 2였다(Table 5). 전체 단백질들에 대한 기능적 분류를 통해 후유리체박리 여부에 따라 비교해 보면 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다(Fig. 2C). 그러나 후유리체박리가 없는 눈에서는 면역체계관련 단백질들과 망막조직의 구조유지와 관련된 단백질들의 발현이 증가된 경향을 보였고, 이에 비해 후유리체박리가 있는 눈에서는 세포부착 및 세포이동과 관련되어 조직의 섬유화와 연관된 단백질들의 발현이 증가하는 경향을 보였다. 네 가지 대표적인 단백질인 S100A8, retinoschisin, filaggrin-2와 galectin-3-binding protein의 MS/MS spectra 결과는 Figure 4에 제시되어 있다(Fig. 4).

고 찰

본 연구를 통해 S100 A7, A8, A9 단백질 발현이 후유리체박리가 없는 특발성 황반원공이나 전단계인 유리체황반변인증후군에서만 발현됨을 알 수 있었다. S100A 단백질군은 세포에 스트레스가 가해질 때 유리되는 damage-associated molecular pattern proteins (DAMPs)로 분류되는 단백질군이다.^{14,15} 그중 S100A7,8,9 단백질들은 급성이나 만성적인 염증질환들에서 발현되는 단백질로 생각하고 있다.^{16,17} 본 연구에서 확인된 S100A 단백질의 기원은 유리체세포가 활성화되어 분비한 것으로 추정되는데 그 이유는 유리체세포가 다른 조직내 대식세포(macrophage)들과 달리 S100 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있기 때문이다.² 유리체세포는 골수에서 기원하여 조직내 macrophage의 역할을 담당하며 일정한 주기를 가지고 교체되는 것으로 알

Table 5. Different profiles of vitreous proteins identified by micro-RPLC-LC-MS/MS according to the presence of posterior vitreous detachment

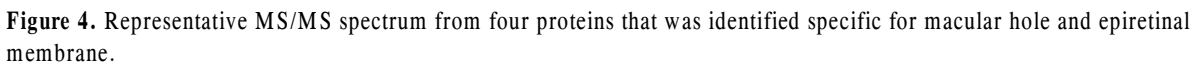
IPI	Gene	Protein name	SC	Location	Function	Tissue specificity
Exclusively detected in the absence of PVD						
IPI00219806	S100A7	Protein S100-A7	2 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00007047	S100A8	Protein S100-A8	2 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00027462	S100A9	Protein S100-A9	3 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00007331	RS1	Retinoschisin	3 ± 1	EC	Structure	Retina
IPI00023020	SEMG1	Semenogelin 1	7 ± 5	EC	Structure	Seminal vesicle
IPI00856046	PALLD	Palladin	2 ± 1	IC	Cytoskeleton	NA
Exclusively detected in the presence of PVD						
IPI00465231	TLL2	Tolloid-like protein 2	2 ± 1	EC	Differentiation	NA
IPI00397801	FGL2	Filaggrin-2	2 ± 1	NA	Binding	NA
IPI00023673	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	8 ± 3	EC	Adhesion	NA
IPI00011302	CD59	CD59	2 ± 1	EC	Immunity	Inflammatory sites
IPI00027350	PRDX2	Peroxiredoxin 2	2 ± 1	IC	Antioxidant	NA
IPI00292150	LTBP2	TGF-beta binding protein 2	2 ± 1	EC	TGF signalling	CNS/glaucoma
Both detected irrespective of PVD, but not detected in control samples						
IPI00025512	HSPB1	Heat shock protein beta 1	2 ± 1	IC	Stress response	CNS
IPI00022077	WASF1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1	2 ± 1	IC	Binding	CNS
IPI00413773	ASTN2	Astrotactin-2	2	EC	NA	NA

SC = spectrum counts; EC = extracellular; IC = intracellular; NA = not applicable; CNS = central nervous system.

려져 있다.¹⁸ 유리체세포는 주로 유리체피질과 유리체 기저부에 존재하고 CD68은 발현하지 않아 다른 조직의 macrophage와 다른 양상을 보인다.²³ 이런 유리체세포는 병적인 환경에서 증식막과 유리체의 수축에 작용을 하는 세포로 알려졌다.^{19,20} 유리체세포는 유리체로 히알루로난을 포함한 다양한 세포외기질을 분비하여 유리체의 구조를 유지하는 역할도 담당한다.²¹ 그리고 유리체세포는 염증유발 사이토카인들에 의해 활성화되어 세포이동, 증식 및 유리체를 수축시키는 것으로 보고되고 있다.²² 최근 조직학적 연구에서 유리체세포는 특발성황반원공이 형성된 근처에서 다른 Glial 세포들이나 망막색소상피와 함께 발견되는 것으로 보고되고 있다.²³ 따라서 저자의 연구결과와 기존연구들을 종합해보면 어떤 이유로든 유리체세포가 활성화되고 이동함에 따라 유리체 피질이 구조적으로 변형되어 후유리체박리가 발생할 가능성을 시사한다고 생각된다. 또한 유리체황반견인증후군과 황반원공에서 동시에 발현되는 것으로 보아 후유리체박리가 발생하면서 지속적인 황반에 대한 유리체 견인이 염증을 초래하여 발현되는 것으로 생각한다.

본 연구를 통해 정상안 및 특발성 황반전막과 비교하여 황반원공의 유리체 단백질 발현이 93% 가량 동일한 소견을 보였지만 몇 가지 미세한 차이점이 있었다. 저자는 황반원공에서 특이적으로 발현되는 10개의 단백질을 확인할 수 있었는데 첫 번째는 망막조직의 구조를 유지시키는 단백질들인 retinoschisin과 semenogelin-1이 황반원공에서만 발현되는 것을 알 수 있었다. Retinoschisin은 망막조직특이

적인 단백질로 망막을 구조적으로 유지시키는 단백질로 알려졌다.²⁴ Retinoschisin 단백질 발현의 이상은 내측망막의 층간분리가 발생하는 유전질환과 밀접한 관련이 있는데 후유리체박리가 없는 황반원공에서만 발현되는 것으로 보아 황반원공의 병리기전에 후유리체박리의 발생과 더불어 망막조직의 구조적인 이상이 내재하고 있다는 것을 암시하는 것이다. 또한 retinoschisin 단백질 발현 이상이 망막조직의 microglia세포의 활성화와 깊은 관련이 있어 황반원공 발생 후 황반원공의 진행과 관련이 있을 것으로 생각한다.²⁵ Semenogelin-1은 유리체에서는 발현되지 않고 망막색소상피에서 발현되는 Zn를 축적하는 단백질로 알려졌다.²⁶ 후유리체박리가 없는 유리체황반견인증후군과 황반원공에서 동시에 발현 되는 것은 황반원공 발생 초기에 망막색소상피가 유리체로 이동하는 현상이 발생하는 것으로 생각한다. Semenogelin-1이 후유리체박리가 발생한 후 황반원공에서 발현되지 않는 것은 망막색소상피가 황반에 대한 유리체 견인이 해소되고 나면 더 이상 유리체로 이동하지 않는 것으로 생각한다. 또한 망막색소상피는 유리체세포에 의해 이동과 기능이 억제되는 것으로 알려졌다.^{27,28} 이러한 연구결과들은 황반원공을 통해 이동된 망막색소상피가 후유리체박리가 발생하는 인접의 유리체세포에 의해 조절되고 이는 특발성 황반원공이 대부분 망막박리로 진행하지 않거나 증식유리체망막병증을 동반하지 않는 이유로 생각할 수 있다.²³ 두 번째는 세포이동과 관련된 기능을 하는 중추신경계에 조직특이성을 가진 단백질들이 황반원공에서만 발현



신경조직 특이성을 보이며 actin 단백질의 발현을 조절하는 기능을 가지고 있는데 이렇듯 세포의 이동과 관련된 단백질들이 후유리체박리 유무와 관련 없이 황반원공에서만 확인되는 것으로 보아 황반원공이 발생한 후 치유과정이나 질병기전과 관련된 망막 및 유리체 세포들의 이동과 관련

되어 있을 것으로 생각된다.³⁰ 마지막으로 조직손상으로부터 보호하는 단백질들로 CD59와 peroxiredoxin-2가 후유리체박리가 있는 황반원공에서만 발현되었다. CD59는 내측망막의 세포들과 망막색소상피가 주로 발현하여 보체계를 조절하는 기능을 가진 단백질로 비특이적인 보체계의 공격으로부터 세포를 보호하는 기능을 가지고 있다.³¹⁻³³ 후유리체박리가 있는 황반원공에서 발현되는 것으로 볼 때 황반원공에 의한 망막의 추가적인 세포손상을 방지하기 위해 분비된 것으로 생각한다. Peroxiredoxin-2도 reactive oxygen radicals에 의한 망막조직손상으로부터 망막세포들을 보호하기 위해 분비되는 것으로 생각한다.³⁴ 따라서 지속적인 황반에 대한 유리체 견인이 해소되고 난 후 망막의 손상을 방지하는 단백질들이 발현되는 것으로 유추할 수 있다.

후유리체박리에 의한 황반에 대한 유리체 견인이 해소되고 난 후 발현되었던 다른 단백질들로 대표적으로 galectin-3-binding protein, tollid-like protein-2과 TGF-beta binding protein을 확인할 수 있었다. 이런 단백질들은 조직의 섬유화나 상처치유반응과 관련된 기능을 하는 것들이었다. Galectin-3-binding protein은 조직손상이 발생할 때 조직의 섬유화와 흉터 형성에 관여하는 단백질로 알려졌다.³⁵ Tollid-like protein 2은 조직 손상 후 세포외기질(extracellular matrix)의 재형성 및 재분배와 관련된 물질로 특히 fibrillar collagen들의 생성과 소멸에 관련된 단백질로 후유리체박리 후 발생한 망막조직손상에 대한 유리체 콜라겐의 형성과 이동에 관련될 것으로 생각한다.³⁶ TGF-beta binding protein은 눈속의 TGF-beta 작용을 조절하는 물질로 섬유화 반응을 유도하는 중추적인 역할을 한다.³⁷ 그러므로 후유리체박리에 의한 유리체 견인이 해소되고 난 후에는 조직 치유 반응의 단백질이 주로 나타난다는 것으로 생각한다.

저자는 나이에 따른 정상안의 유리체 단백질 분석에서 단백질의 농도, 개수 및 성상에 차이가 없는 결과를 얻었다. 이는 대상 샘플수가 부족한 점과 아직도 현재의 프로테오믹스 기법으로는 미세한 유리체 단백질 성상의 변화를 찾아내기 힘들어 나이에 따른 차이를 알기 어려웠던 것으로 생각한다. 본 연구에서 사용된 프로테오믹스기법을 이용하여 기존의 보고되지 않았던 12개의 단백질을 정상안에서 확인할 수 있었다. 이러한 단백질들의 특징은 중추신경계나 연골의 조직특이성을 보이며 세포막이나 세포외로 분비되는 특성을 보였다. 새로운 단백질들은 세포의 유착, 분화 및 망막이나 유리체 조직 구조를 유지하는 기능과 관련이 많은 것들이었다. 12개의 단백질들 중 특이한 단백질이 몇 개 확인되었는데 Oligodendrocyte-myelin glycoprotein은 신

경계에서 neurite의 성장을 방해하고 axonogenesis를 조절하는 단백질로 정상안에서 시신경의 myelination을 억제하는 기능을 할 것으로 생각한다.³⁸ Chondromodulin-1은 혈관이 적은 조직에서 조직특이적인 항신생혈관형성 작용을 하는 것으로 알려졌고 유리체가 정상적으로 항신생혈관형성 기능을 할 것을 시사한다고 할 수 있다.³⁹ Vasinin은 대동맥에서 주로 발현되는 강력한 TGF-beta억제작용을 하는 물질로 유리체에서 병리적인 TGF-beta의 작용을 조절하는 기능을 담당할 것으로 생각한다.⁴⁰

결론적으로 황반원공의 유리체 단백질 발현은 정상안과 황반전막과 비교하여 미세한(7.3%) 차이가 있었고 후유리체박리로 인한 황반에 대한 유리체 견인의 유무와 유의한 관련이 있었다. 후유리체박리가 없는 황반에 대한 유리체 견인이 존재하는 황반원공에서는 유리체세포의 활성화와 망막조직구조의 이상과 관련된 단백질의 발현이 증가하는 것으로 생각하고 후유리체박리가 발생하여 유리체 견인이 해소된 황반원공이나 황반전막에서는 조직의 상처치유반응과 관련된 조직섬유화 단백질과 세포의 기능을 보호하려는 단백질이 증가된다고 생각한다. 나이에 따른 유리체 단백질의 뚜렷한 정성적인 차이는 보이지 않았다.

참고문헌

- 1) Sebag J, Balazs EA. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1867-71.
- 2) Lazarus HS, Hageman GS. In situ characterization of the human hyalocyte. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1356-62.
- 3) Gärtner J. The fine structure of the vitreous base of the human eye and pathogenesis of pars planitis. *Am J Ophthalmol* 1971;71:1317-27.
- 4) Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organization of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:323-44.
- 5) Gaudric A, Haouchine B, Massin P, et al. Macular hole formation: new data provided by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 1999;117:744-51.
- 6) Hikichi T, Yoshida A, Trempe CL. Course of vitreomacular traction syndrome. *Am J Ophthalmol* 1995;119:55-61.
- 7) Foos RY. Ultrastructural features of posterior vitreous detachment. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1975;196:103-11.
- 8) Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:1177-87.
- 9) Peng J, Elias JE, Thoreen CC, et al. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res* 2003;2:43-50.
- 10) Shen Y, Zhao R, Berger SJ, et al. High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. *Anal Chem* 2002;74:4235-49.
- 11) Gao BB, Chen X, Timothy N, et al. Characterization of the vitreous

- proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res* 2008;7: 2516-25.
- 12) Kim T, Kim SJ, Kim K, et al. Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. *Proteomics* 2007;7:4203-15.
- 13) Yu J, Liu F, Cui SJ, et al. Vitreous proteomic analysis of proliferative vitreoretinopathy. *Proteomics* 2008;8:3667-78.
- 14) Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, et al. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *J Leukoc Biol* 2009; 86:577-87.
- 15) Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1111-22.
- 16) Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, et al. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2009;86:557-66.
- 17) Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol* 2000;35:521-32.
- 18) Qiao H, Hisatomi T, Sonoda KH, et al. The characterisation of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *Br J Ophthalmol* 2005;89:513-7.
- 19) Kita T, Hata Y, Arita R, et al. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17504-9.
- 20) Kohno RI, Hata Y, Kawahara S, et al. Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. *Br J Ophthalmol* 2009;93:1020-6.
- 21) Sommer F, Pollinger K, Brandl F, et al. Hyalocyte proliferation and ECM accumulation modulated by bFGF and TGF-beta1. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:1275-84.
- 22) Hata Y, Nakao S, Kohno R, et al. Role of tumour necrosis factor- α (TNF α) in the functional properties of hyalocytes. *Br J Ophthalmol* 2011;95:261-5.
- 23) Gandorfer A, Scheler R, Haritoglou C, et al. Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina* 2009;29:1097-105.
- 24) Molday RS. Focus on molecules: retinoschisin (RS1). *Exp Eye Res* 2007;84:227-8.
- 25) Karlstetter M, Walczak Y, Weigelt K, et al. The novel activated microglia/macrophage WAP domain protein, AMWAP, acts as a counter-regulator of proinflammatory response. *J Immunol* 2010; 185:3379-90.
- 26) Bonilha VL, Rayborn ME, Shadrach K, et al. Characterization of semenogelin proteins in the human retina. *Exp Eye Res* 2006; 83:120-7.
- 27) Lazarus HS, Schoenfeld CL, Fekrat S, et al. Hyalocytes synthesize and secrete inhibitors of retinal pigment epithelial cell proliferation in vitro. *Arch Ophthalmol* 1996;114:731-6.
- 28) Schönfeld CL. Hyalocytes inhibit retinal pigment epithelium cell proliferation in vitro. *Ger J Ophthalmol* 1996;5:224-8.
- 29) Doshi BM, Hightower LE, Lee J. HSPB1, actin filament dynamics, and aging cells. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1197:76-84.
- 30) Miki H, Takenawa T. Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem* 2003;134:309-13.
- 31) Yang P, Tyrrell J, Han I, Jaffe GJ. Expression and modulation of RPE cell membrane complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3473-81.
- 32) Vogt SD, Barnum SR, Curcio CA, Read RW. Distribution of complement anaphylatoxin receptors and membrane-bound regulators in normal human retina. *Exp Eye Res* 2006;83:834-40.
- 33) Liversidge J, Dawson R, Hoey S, et al. CD59 and CD48 expressed by rat retinal pigment epithelial cells are major ligands for the CD2-mediated alternative pathway of T cell activation. *J Immunol* 1996;156:3696-703.
- 34) Fatma N, Kubo E, Sen M, et al. Peroxiredoxin 6 delivery attenuates TNF-alpha and glutamate-induced retinal ganglion cell death by limiting ROS levels and maintaining Ca²⁺ homeostasis. *Brain Res* 2008;1233:63-78.
- 35) Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009;230:160-71.
- 36) Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, et al. Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev Biol* 1999;213:283-300.
- 37) Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 2008;27:177-96.
- 38) Wang KC, Koprivica V, Kim JA, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002;417:941-4.
- 39) Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y. Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:299-307.
- 40) Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, et al. Vasin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10732-7.

=ABSTRACT=

Human Vitreous Proteomes in Idiopathic Macular Hole

Kwang Hoon Lee, MD¹, Jae Kyoung Ahn, MD, PhD²

*Happyeye21 Clinic¹, Gwangju, Korea
Samsung Eye & ENT Clinic Center², Jeonju, Korea*

Purpose: To investigate the vitreous proteomic profiles of macular hole (MH) patients compared to donor eyes and epiretinal membrane (ERM) patients.

Methods: Ten donor eyes, 25 MH patients (15 MH without posterior vitreous detachment (PVD) and 10 MH with PVD), 10 ERM patients and 4 patients with vitreomacular traction syndrome (VMTS) were enrolled in the present study. The undiluted vitreous samples were obtained from all eyes. Proteins were identified using the micro-RPLC/MS/MS technique and using mass spectrometric data analysis from the IPI database. Proteins were searched for the function, subcellular location and tissue specificity using the Uniprot database.

Results: The mean vitreous protein concentrations were the highest ($p < 0.01$) in MH patients without PVD. There were no qualitative changes according to the age of donor eyes. However, the authors newly-identified 12 proteins (i.e. vasorin) in donor eyes. Ten out of 136 proteins (7.3%) (i.e. retinoschisin) were exclusively detected in the MH samples. S100A8 was exclusively detected in eyes without PVD, whereas CD59 was exclusively detected in eyes with PVD.

Conclusions: The results suggest there is a small difference in the vitreous proteomic profiles in MH patients compared to donor eyes or ERM patients, and that the expression of vitreous proteins is closely associated with the presence of PVD. J Korean Ophthalmol Soc 2012;53(10):1512-1522

Key Words: Macular hole, Posterior vitreous detachment, Proteomics, S100, Vitreous

Address reprint requests to **Jae Kyoung Ahn, MD, PhD**
Samsung Eye & ENT Clinic Center
#225 Ujeon-ro, Wansan-gu, Jeonju 560-800, Korea
Tel: 82-63-220-0114, Fax: 82-63-220-0100, E-mail: Opth20@freechal.com