

돌연변이 마이오실린 발현에 의한 섬유주세포 사멸 및 그 기전

임동희¹ · 손성수¹ · 김태은² · 기창원¹

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 안과학교실¹, 삼성생명과학연구소 임상의학연구센터²

목적: 돌연변이 마이오실린(mutant myocilin)의 발현이 섬유주세포 사멸을 일으키는지 알아보고 그 기전이 세포자멸사(apoptosis)에 의한 것인지를 살펴보고자 한다.

대상과 방법: 재조합 아데노바이러스(recombinant adenovirus)를 매개로 인간 돌연변이 마이오실린(Q368X)을 인간 섬유주세포에서 발현시킨 후 세포증식분석법(cell proliferation assay), 흐름세포측정법(flow cytometry), 웨스턴블롯분석법(Western blot analysis) 및 면역세포화학분석(immunocytochemistry)을 실시하여 세포자멸사에 의한 세포 사멸 정도를 분석하였다.

결과: 돌연변이 마이오실린의 발현 그 자체가 섬유주세포 사멸을 야기하는 것으로 생각되지는 않았으며 또한 돌연변이 마이오실린의 발현은 비록 unfolded protein response (UPR)를 유발하였으나 세포자멸사를 초래하지는 않는 것으로 생각되었다.

결론: 본 결과는 마이오실린 녹내장(myocilin glaucoma)의 기전이 세포자멸사에 의한 섬유주세포 사멸이 아닌 다른 것일 가능성을 시사한다.

〈대한안과학회지 2011;52(12):1507-1513〉

원발 개방각 녹내장이 유전적 소인을 보임은 오래 전부터 알려져 왔으며 이러한 소인을 보이는 대규모 가계를 대상으로 실시한 연관 분석(linkage analysis)의 결과 염색체 1q21-q31 부위에 위치한 *MYOC*가 원인유전자(*GLC1A*)의 하나임이 밝혀졌다.¹ *MYOC*는 이전에 trabecular mesh-work-inducible glucocorticoid response (TIGR)로 불렸으며 그 이름이 암시하듯 섬유주세포에서 유일하게 당알코르티코이드에 의해서만 발현되는 특징이 있다.^{2,3} *MYOC*는 마이오실린이라는 당단백질을 암호화한다. 마이오실린은 504개의 아미노산으로 구성된 분자량 55 kDa 정도의 산성 당단백질로서 독특하게도 세포의 소포체(endoplasmic reticulum; ER) 내에 존재하기도 하고 세포 밖으로 분비(secretion)되기도 한다.^{3,4}

*MYOC*상의 돌연변이에 의한 녹내장은 마이오실린 녹내장이라고 한다.⁵ 마이오실린 녹내장은 전체 원발 개방각 녹내장 환자의 약 3-4%를 차지하며 이 비율은 인종 간에 큰 차이가 없다. 지금까지 70여 가지 이상의 다양한 질병 유발 돌연변이(disease-causing mutation)가 *MYOC*에서

발견되었으며 이중 Q368X가 가장 흔하고 다음으로 R46X가 많이 발견된다.^{1,6,7} Q368X는 주로 유럽 인종에서 흔히 볼 수 있으나 한국인 집단에서는 아직 확인된 바 없다. 반면에 R46X는 한국인에서도 존재하는 것으로 보고되어 있다.⁸

마이오실린 녹내장의 기전은 병적인 기능 획득 돌연변이(gain of (pathogenic) function)인 것으로 여겨진다. 그 증거로서 유전학적으로 한쪽 염색체의 1q21-q24 부위가 결손(deletion)된 사람(*MYOC*에 대한 반접합체, hemizygote)에서 녹내장이 없었다는 보고,⁹ 양쪽 염색체상에 모두 R46X 돌연변이를 갖고 있음에도 불구하고 76세까지 녹내장 소견을 전혀 보이지 않았다는 보고¹⁰ 및 *MYOC*에 대한 knockout mice가 안과학적인 면에서 정상이라는 사실¹¹ 등이 있다. 생화학적으로는 돌연변이 마이오실린은 야생형 마이오실린(wild-type myocilin)에 비해 응집하는 경향이 있고 분비되지 않으며 야생형 마이오실린의 분비도 억제하는 성질을 들 수 있다.¹²⁻¹⁴ 또한 저자들이 보고한 돌연변이 마이오실린의 강력한 세포독성도 마이오실린 녹내장의 기전이 기능 획득 돌연변이임을 강력히 시사한다.^{4,15}

한편 돌연변이 마이오실린의 발현 및 세포 내 축적이 단순히 세포독성을 보이는 수준을 넘어 세포자멸사를 유발하여 세포 사멸까지 초래한다는 보고도 있다.^{16,17} 그러나 저자들은 이전 연구에서 기존 보고와 달리 돌연변이 마이오실린

■ 접수 일: 2011년 3월 21일 ■ 심사통과일: 2011년 6월 1일
■ 게재허가일: 2011년 10월 12일

■ 책임저자: 기 창 원

서울시 강남구 일원동 50
삼성서울병원 안과
Tel: 02-3410-3564, Fax: 02-3410-0074
E-mail: cw.kee@samsung.com

의 발현에 따른 세포자멸사를 전혀 관찰하지 못하였다.^{4,15} 이에 본 연구에서는 인간 섬유주세포를 대상으로 돌연변이 마이오실린(Q368X)의 발현에 의한 세포자멸사의 발생 가능성을 재고해 보았다.

대상과 방법

세포배양

섬유주세포(human trabecular meshwork cells, HTM cells)는 27살 여성의 정상 안구에서 유래한 것으로 Paul L. Kaufman (University of Wisconsin, Madison, WI, USA)에게 얻어 5% CO₂를 함유한 37°C 배양기에서 항생제와 10% 우태아혈청(Gibco, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco)으로 배양하였다.

세포생존율 측정

섬유주세포를 96 well plate에 30% confluence로 분주하고 다음날 돌연변이 마이오실린(Q368X) 발현 아데노바이러스(Ad-Q368X)를 세포당 10-50 plaque forming units (pfu)의 MOI (multiplicity of infection)로 감염시켰다. Ad-Q368X는 거대세포바이러스 촉진염기서열(cytomegalovirus promoter)로 돌연변이 마이오실린을 green fluorescence protein의 N-말단과 융합하여 발현하는 복제결핍 재조합 아데노바이러스(replication-deficient recombinant adenovirus)이다. 2일, 3일 및 4일 후 세포독성 측정용 시약(WST-8; Dojindo, Rockville, MD, USA)을 well 당 10 µl 씩 첨가한 후 1시간 뒤 automatic microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 적정 농도의 thapsigargin (Tg)을 48시간 동안 처리한 세포를 사용하였다.

Western blot analysis

섬유주세포를 100 mm 배양접시에 70% confluence로 분주하고 다음 날 Ad-Q368X를 세포당 10-50 pfu의 MOI로 감염시켰다. 48시간 후 세포를 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 및 protease inhibitor를 함유한 lysis buffer로 용해한 뒤 영하 70°C에서 30분 동안 얼린 다음 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 얻었다. Bradford 법으로 단백질 농도를 측정한 후 30 µg의 단백질

을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 뒤 polyvinylidene difluoride membrane에 옮겼다. Membrane을 상온에서 5% 탈지분유를 포함한 1X TBST (50 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.05% Tween 20)로 blocking한 후, 4°C에서 항 78 kDa glucose-regulated protein (Grp78) 항체 (Stressgen, Victoria, CA), 항 phospho-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) 항체(Cell Signaling Laboratory, Beverly, MA, USA), 항 caspase-3 항체(Cell Signaling Laboratory), 및 항 tubulin 항체(Sigma, St Louis, MO, USA)와 16시간 동안 반응시켰다. 세척 후, membrane을 horseradish peroxidase가 붙은 항 mouse IgG 항체 또는 항 rabbit IgG 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 반응시킨 뒤, enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)를 실시하였다.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

섬유주세포를 60 mm 배양접시에 70% confluence로 분주하고 다음 날 Ad-Q368X를 세포당 50 pfu의 MOI로 감염시켰다. 48시간 후, 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 두 번 세척한 뒤 약 10⁶개의 세포를 binding buffer (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)에 부유한 다음, 5 µl의 FITC-conjugated Annexin V (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 5 µl의 propidium iodide와 혼합하였다. 암실에서 15분 동안 부치한 후, 1 ml의 binding buffer를 첨가한 후 약 10⁴개의 세포를 대상으로 유세포분석기(FACS Aria, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하여 개개의 형광표지정도를 측정하였다.

Caspase-3 활성 측정

섬유주세포를 4 well chamber slide에 30 % confluence로 분주하고 다음 날 Ad-Q368X를 세포당 20-50 pfu의 MOI로 감염시켰다. 48시간 후, 세포를 caspase-3의 기질인 MR-(DEVD)₂ (MorphoSys, Oxford, UK)을 함유한 새 배양액으로 갈아준 뒤 37°C에서 60분 동안 배양하였다. 세포를 한 번 세척한 후 Hoechst stain (0.5% v/v)을 함유한 새 배양액으로 교환하고 37°C에서 10분 동안 배양한 다음 플라스틱 틀을 제거한 후 새 배양액을 한 방울 떨어뜨린 뒤 덮개 유리(cover slip)를 덮은 다음 즉시 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

돌연변이 마이오실린의 잠재적 세포독성이 세포사멸을 야기하는지의 여부를 알아보기 위하여 Q368X 돌연변이를 갖는 돌연변이 마이오실린을 아데노바이러스를 매개로 인간 섬유주세포에서 발현시켰다. 유전자 전달을 아데노바이

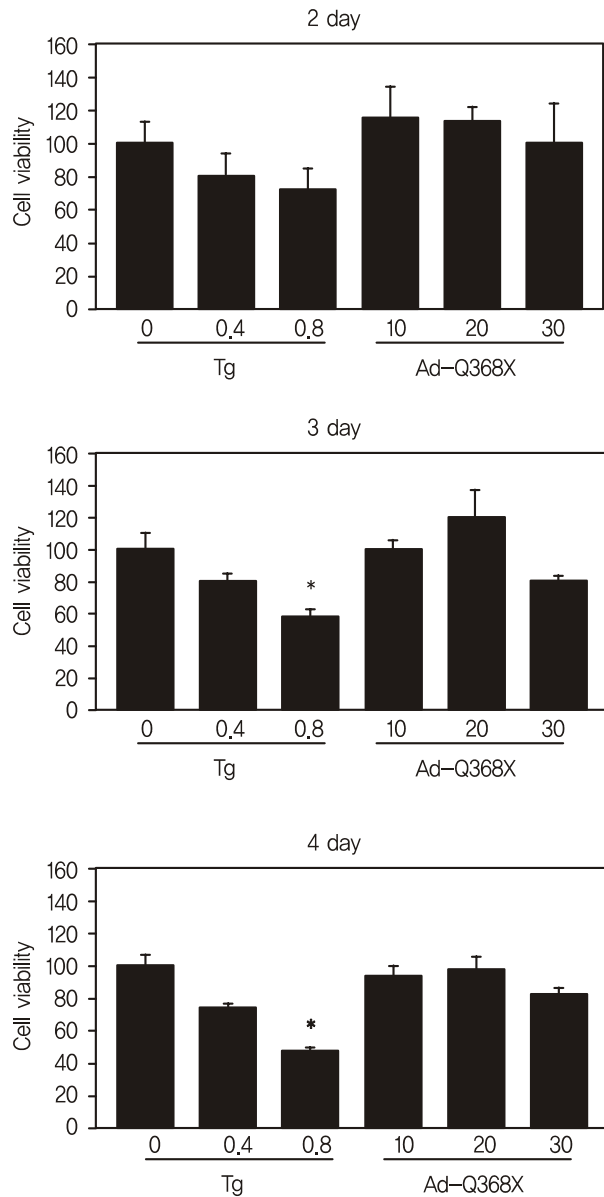


Figure 1. Effect of mutant myocilin expression on cell viability. HTM cells were transduced at an MOI indicated with an adenovirus expressing mutant (Q368X) myocilin (Ad-Q368X), and 2, 3, and 4 days after transduction, subjected to cell proliferation assay. Cells treated for 48 hours with Tg were included as positive controls. Each column represents the means from three different wells of three independent experiments with the bars denoting the standard deviation. * $p < 0.01$ vs. control (Dunnet's test).

러스를 매개로 한 이유는 섬유주세포는 통상적으로 유전자 전달감염 효율(transfection efficiency)이 매우 낮기 때문이며 따라서 본 연구에서는 모든 돌연변이 마이오실린의 발현은 아데노바이러스를 매개로 하였다. 섬유주세포는 돌연변이 마이오실린 발현 후 4일이 지나도록 가장 높은 발현에서도 통계적으로 의미 있게 사멸하지 않았다. 반면에 양성대조군인 Tg를 처리한 세포는 0.8 nM에서 통계적으로 유의한 사멸을 보였다(Fig. 1).

돌연변이 마이오실린의 발현이 세포사멸사를 일으키는지의 여부를 알아보기 위하여 섬유주세포에서 돌연변이 마이오실린을 발현시킨 후 개개 세포의 세포사멸사의 정도를 흐름세포측정법으로 분석하였다. 돌연변이 마이오실린 발현 후 72시간에서 세포사멸사가 15% 이하로 미약하게 관찰되었다. 음성대조군에서는 세포사멸사가 5% 이하에서만 나타난 반면에 양성대조군에서는 60% 이상에서 관찰되었다(Fig. 2).

돌연변이 마이오실린의 발현에 의한 세포사멸사의 발생을 생화학적으로 분석하기 위하여 돌연변이 마이오실린의 발현에 따른 세포사멸사 단백질 표지자(apoptotic protein marker)의 유도 또는 활성화를 면역블롯법(immunoblot)으로 확인하였다. 소포체의 stress 표지자인 GRP78의 경우 음성대조군과 비교하여 양성대조군은 물론 돌연변이 마이오실린 발현 세포에서 그 발현이 확연히 증가하였다. Phosphated-JNK의 경우도 음성대조군과 비교하여 양성대조군에서 그 발현이 두드러지게 증가하였으며 돌연변이 마이오실린 발현 세포에서도 비록 GRP78과 달리 용량-반응(dose-response) 관계를 보이지는 않았지만 확연한 증가 추세를 보였다. 대표적 세포사멸사 표지자인 caspase-3의 경우 양성대조군에서는 분명히 활성화되었다. 그러나 돌연변이 마이오실린 발현 세포에서는 그 활성화 정도가 음성대조군보다는 높지만 양성대조군에 비하면 아주 미약하였다(Fig. 3).

돌연변이 마이오실린의 발현에 의한 caspase-3의 활성화를 확증하기 위하여 돌연변이 마이오실린 발현 섬유주세포에서 caspase-3의 활성도를 면역세포화학분석하였다. 면역블롯법 결과와 마찬가지로 caspase-3는 음성대조군에서는 거의 활성화되지 않았지만(Fig. 4A) 양성대조군에서는 눈에 띄게 활성화되는 것으로 보였다(Fig. 4B). 그러나 caspase-3는 돌연변이 마이오실린의 발현에 의해 활성화되지 않았다(Fig. 4C, D). 또한 caspase-3는 돌연변이 마이오실린의 발현이 증가하여도 활성화되지 않았다(Fig. 4E, F).

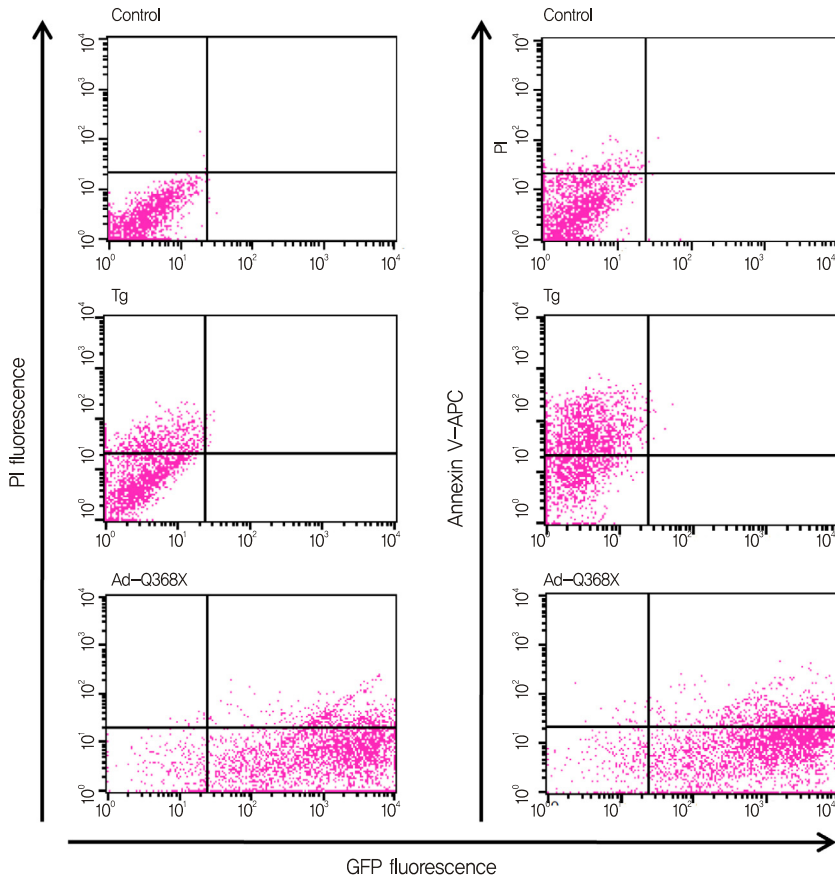


Figure 2. Quantitative analysis of apoptotic cell death caused by mutant myocilin expression. HTM cells were transduced at an MOI of 50 pfu per cell with AdQ368X, and 48 hours later, stained with Annexin V-APC or propidium iodide (PI) and then analyzed by flow cytometry. Cells treated for 48 hours with 400 μ M Tg served as positive controls. Shown are representative of three independent experiments with similar results.

고 찰

마이오실린의 기능은 알려진 것이 거의 없지만 마이오실린 녹내장의 기전에 관해서는 많은 연구가 진행되어 있다. 마이오실린은 유일하게 안구와 근육조직 이외에 다른 조직에서는 거의 볼 수 없으며 안구에서도 섬유주에서 두드러지게 많이 존재할 뿐 모양체, 공막, 망막신경조직 등을 포함하는 다른 안구 조직에서는 미미한 양만이 발현한다.¹⁸ 돌연변이 마이오실린은 misfolding 또는 unfolding되어 세포 밖으로 분비되지 않고 소포체에 축적되며 이때 자신은 물론 야생형 마이오실린도 축적시키는 dominant negative의 특징을 보인다.^{4,12-15} 일반적으로 misfolded 또는 unfolded protein이 소포체에 축적되게 되면 소포체의 stress를 유발하여 unfolded protein response를 야기하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 본 연구자는 돌연변이 마이오실린도 소포체에 축적하게 되면 잠재적으로 세포독성을 보인다는 것을 규명한 바 있다.^{4,15} 섬유주는 각종 당아미노글리칸(glycosaminoglycan), 당단백질 및 섬유원성 물질(fibrillar material) 등을 합성하고 분비할 뿐만 아니라 식균작용도 한다. 특히 섬유주세포는 여러 가지 노폐물을 활발한 식균활동으로 처리함으로써 방수유출경로를 구조 및 기능적으로 완전하게 유지하는 역

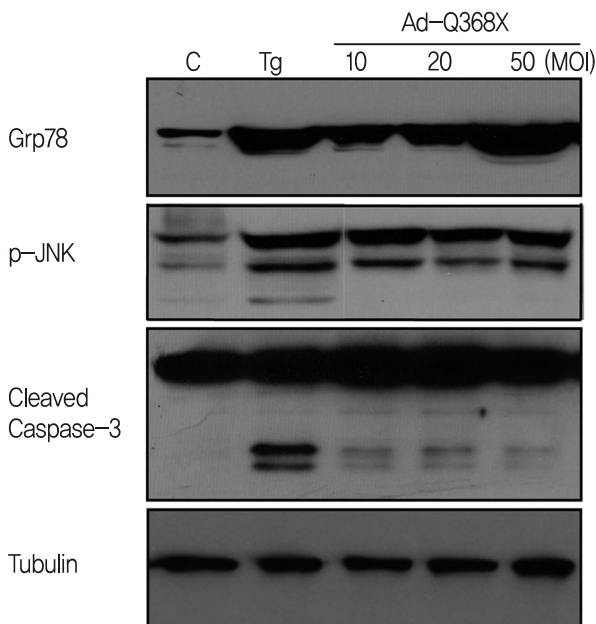


Figure 3. Western blots showing the effect of mutant myocilin expression on the level of Grp78, p-JNK, and cleaved caspase-3. HTM cells transduced at an MOI indicated with Ad-Q368X. After 48 hours, cell lysates were assayed for Grp78, p-JNK and cleaved caspase 3 by Western blot analysis. Data were normalized with α -tubulin expression.

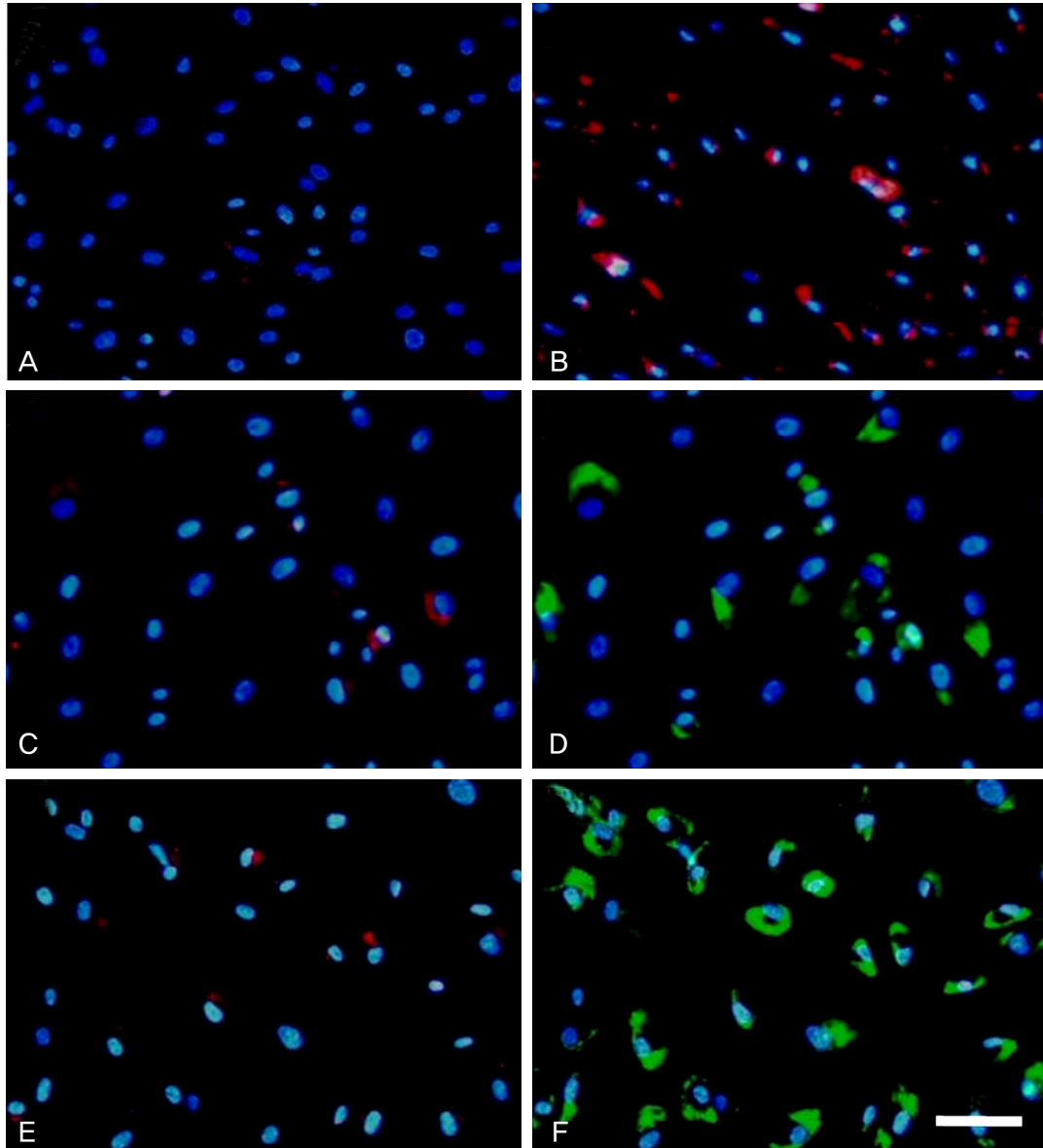


Figure 4. Effect of mutant myocilin expression on the activation of caspase-3. HTM cells were transduced at an MOI of 50 (C, D) or 100 pfu (E, F) per cell with Ad-Q368X, and after 48 hours, stained with aspartylglutamyl-lalanylaspatic acid (DEVD) coupled to cresyl violet, MR-(DEVD)2 (A, B, C, and E). Cells untreated (A) or treated (B) with 400 μ M of Tg served as controls. Red fluorescence and green fluorescence represent caspase-3 activity and GFP-tagged myocilin expression, respectively. Blue fluorescence corresponds to nuclei stained with Hoechst 33342. Bar: 100 μ m.

할을 한다. 따라서 섬유주세포에서 돌연변이 마이오실린의 발현은 자체의 잠재적 세포독성으로 인하여 섬유주세포의 기능 저하를 초래할 것이고 이는 궁극적으로 방수유출경로의 폐쇄 등으로 이어져 결과적으로 원발 개방각 녹내장의 원인으로 작용할 것이다. 이러한 가설은 MYOC의 염색체상의 위치와 마이오실린의 dominant negative의 작용 등과 결부하여 원발 개방각 녹내장의 상염색체상의 우성유전과 잘 부합한다.

근래 돌연변이 마이오실린의 발현이 세포증식분석상에

서 장기적으로 섬유주세포의 사멸을 보였다는 보고가 있다.^{16,17} 그러나 본 연구에서 돌연변이 마이오실린의 발현은 세포독성을 보일지언정 세포사멸까지 초래하지는 않았다. 일반적으로 어떤 물질에 의한 세포사멸을 세포증식분석법으로 보는 경우 신경세포와 같이 분열을 거의 하지 않는 세포주를 사용한다면 장시간 관찰하는 것도 무방하지만 섬유주세포와 같이 왕성히 분열하는 세포주를 사용한다면 단시간에 마쳐야만 한다. 이전 연구에서는 돌연변이 마이오실린 (P370L)을 인간 섬유주세포에서 발현시킨 후 무려 20일

뒤 Hoechst 33342로 염색한 다음 세포의 수를 산정하였다. 따라서 단순히 세포수만 보고 세포사멸이라는 결론을 내릴 경우 세포독성에 의해 세포분열이 감소 또는 정지했을 뿐 세포가 사멸하지는 않았을 가능성을 배제할 수 없다. 본 연구에서도 돌연변이 마이오실린(Q368X)의 발현이 비록 통계적으로 무의미하지만 표면적으로는 어느 정도 섬유주세포의 사멸을 초래하는 것처럼 보인다. 본 연구 역시 세포의 수에 비례하는 효소 활성을 측정할 세포증식분석법에 근거하였기 때문에 정확히 세포사멸을 감별했다고 볼 수 없다. Q368X 돌연변이도 P370L 돌연변이 못지않은 원발 개방각 녹내장 유발인자라는 점을 고려할 때 돌연변이 마이오실린의 세포독성이 과연 섬유주세포가 사멸할 만큼 강력한지는 현재로서는 불분명하다.

한편 Yam et al¹⁷은 돌연변이 마이오실린의 발현이 세포사멸을 야기한다고 보고하였다. 이는 돌연변이 마이오실린의 발현과 세포사멸 사이의 공백을 메우는 것으로 마이오실린 녹내장의 기전을 분자세포학적으로 설명한다는 점에서 의미가 있다. 그러나 Yam et al¹⁷은 돌연변이 마이오실린의 발현에 의한 세포사멸을 CHO와 HEK293과 같은 안과학적으로 전혀 관련이 없는 일반 세포주에서 주로 관찰하였고 인간 섬유주세포에서는 부수적으로 그것도 일차배양세포주가 아닌 불멸화한 세포주에서만 보았다. 본 연구에서는 Yam et al¹⁷의 연구와 달리 돌연변이 마이오실린의 발현이 세포사멸을 야기한다는 명백한 증거를 찾지 못하였다. 본 연구에서는 일차배양 인간 섬유주세포에서만 보았기에 본 연구 결과와 Yam et al¹⁷의 연구 결과와의 불일치가 세포주의 상이에서 기인하는지 아니면 다른 요인에 있는지 현재로서는 알 수가 없다. 본 연구에서 돌연변이 마이오실린의 발현은 이전의 많은 연구에서와 같이 소포체의 stress를 야기하였고 이를 신호로 하위신호인 JNK의 활성화까지는 일어났으나 보다 하위신호로서 세포사멸에서 매우 중요한 역할을 수행하는 caspase-3의 활성화에는 이르지 못하였다. 세포가 소포체의 stress를 받게 되면 unfolded protein response의 일환으로 JNK 활성화를 통한 caspase-3의 활성화에 의해 세포사멸이 일어난다는 신호전달과정은 이미 잘 확립된 사실이다.²⁰ 그러나 JNK 활성화가 반드시 caspase-3의 활성화로 이어지지 않고 세포예정사(programmed cell death)의 일종인 자가포식현상(autophagy)으로 진행된다는 보고도 있다.²¹ 따라서 돌연변이 마이오실린의 발현에 따른 소포체 stress의 영향으로 비록 JNK까지 활성화되었어도 이것이 곧 세포사멸의 전제는 아니다. 그러므로 분명한 것은 돌연변이 마이오실린의 발현과 그로 인한 세포사멸 또는 세포사멸의 인과관계는 보다 여러 가지 관점에서 다양한 형태의 방법론적 접근으

로 다루어져야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에서 저자들은 이전 보고와 달리 돌연변이 마이오실린의 발현이 세포사멸을 야기하거나 세포사멸을 초래한다는 결과를 얻지 못하였다. 따라서 마이오실린 녹내장의 기전은 세포사멸사에 의한 세포사멸이 아닌 다른 원인과 결부된 복합적인 것일 가능성이 있다. 일례로서 최근에 발표된 돌연변이 마이오실린의 발현이 세포를 oxidative stress에 의한 세포사멸사에 쉽게 노출되도록 감작한다는 보고를 들 수 있다.²²

참고문헌

- 1) Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997;275:668-70.
- 2) Polansky JR, Kurtz RM, Alvarado JA, et al. Eicosanoid production and glucocorticoid regulatory mechanisms in cultured human trabecular meshwork cells. *Prog Clin Biol Res* 1989;312:113-38.
- 3) Nguyen TD, Chen P, Huang WD, et al. Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. *J Biol Chem* 1998;273:6341-50.
- 4) Sohn S, Hur W, Joe MK, et al. Expression of wild-type and truncated myocilins in trabecular meshwork cells: their subcellular localizations and cytotoxicities. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3680-5.
- 5) Fingert JH, Stone EM, Sheffield VC, Alward WL. Myocilin glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2002;47:547-61.
- 6) Alward WL, Fingert JH, Coote MA, et al. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N Engl J Med* 1998;338:1022-7.
- 7) Fingert JH, Heon E, Liebmann JM, et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 1999;8:899-905.
- 8) Yoon SJ, Kim HS, Moon JI, et al. Mutations of the TIGR/MYOC gene in primary open-angle glaucoma in Korea. *Am J Hum Genet* 1999;64:1775-8.
- 9) Wiggs JL, Vollrath D. Molecular and clinical evaluation of a patient hemizygous for TIGR/MYOC. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1674-8.
- 10) Lam DS, Leung YF, Chua JK, et al. Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1386-91.
- 11) Kim BS, Savinova OV, Reedy MV, et al. Targeted disruption of the myocilin gene (Myoc) suggests that human glaucoma-causing mutations are gain of function. *Mol Cell Biol* 2001;21:7707-13.
- 12) Zhou ZH, Vollrath D. A cellular assay distinguishes normal and mutant TIGR/myocilin protein. *Hum Mol Genet* 1999;8:2221-8.
- 13) Caballero M, Borrás T. Inefficient processing of an olfactomedin-deficient myocilin mutant: Potential physiological relevance to glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:662-70.
- 14) Jacobson N, Andrews M, Shepard AR, et al. Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor. *Hum Mol Genet* 2001;

- 10:117-25.
- 15) Joe MK, Sohn S, Hur W, et al. Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:592-600.
- 16) Liu Y, Vollrath D. Reversal of mutant myocilin non-secretion and cell killing: implications for glaucoma. *Hum Mol Genet* 2004;13:1193-204.
- 17) Yam GH, Gaplovska-Kysela K, Zuber C, Roth J. Aggregated myocilin induces Russell bodies and causes apoptosis - Implications for the pathogenesis of myocilin-caused primary open-angle glaucoma. *Am J Pathol* 2007;170:100-9.
- 18) Karali A, Russell P, Stefani FH, Tamm ER. Localization of myocilin/trabecular meshwork--inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41: 729-40.
- 19) Rutkowski DT, Hegde RS. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 2010;189:783-94.
- 20) Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 2006;11:5-13.
- 21) Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, Lu B. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle* 2007;6:793-8.
- 22) Joe MK, Tomarev SI. Expression of myocilin mutants sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis: implication for glaucoma pathogenesis. *Am J Pathol* 2010;176:2880-90.

=ABSTRACT=

Mechanisms Underlying Trabecular Meshwork Cell Death Caused by Mutant Myocilin Expression

Dong Hui Lim, MD¹, Seongsoo Sohn, PhD¹, Tae Eun Kim, PhD², Changwon Kee, MD, PhD¹

*Department of Ophthalmology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine¹, Seoul, Korea
Center for Clinical Research, Samsung Biomedical Research Institute², Seoul, Korea*

Purpose: To determine whether the expression of mutant myocilin can lead to death of human trabecular meshwork (HTM) cells and to determine whether the mechanism by which this occurs is apoptosis.

Methods: HTM cells were transduced with a recombinant adenovirus expressing human mutant (Q368X) myocilin. The apoptotic death of HTM cells caused by expression of mutant myocilin was examined using a cell proliferation assay, flow cytometry, Western blot analysis, and immunocytochemistry.

Results: It appeared that the expression of mutant myocilin itself was not sufficient to cause HTM cell death. Furthermore, the expression of mutant myocilin did not lead to apoptosis of HTM cells although it did elicit a protein unfolding response.

Conclusions: Our data suggest that the mechanism of myocilin glaucoma is not apoptotic death of HTM cells caused by mutant myocilin expression, and that the actual mechanism remains unknown.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(12):1507-1513

Key Words: Apoptosis, Myocilin, Primary open-angle glaucoma, Trabecular meshwork

Address reprint requests to **Changwon Kee, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine
50 Irwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea
Tel: 82-2-3410-3564, Fax: 82-2-3410-0074, E-mail: cw.kee@samsung.com