브라질산 주머니쥐(*Monodelphis domestica*) 망막 내에서의 calretinin 면역반응성을 가지는 AII 무축삭세포의 동정

정세진^{1,2}, 전창진^{1,2,*}

¹경북대학교 자연과학대학 생명과학부, 대구 702-701

²경북대학교 첨단복합 생명과학인력 양성사업단, 대구 702-701

투고일(2014년 05월 19일), 수정일(2014년 06월 12일), 게재확정일(2014년 6월 18일)

목적: 본 연구의 목적은 브라질산 주머니쥐(*Monodelphis domestica*) 망막에서의 calretinin 면역반응성을 연구하는 데에 있다. 칼슘결합단백질 calretinin은 칼슘매개-신호전달에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. **방법:** 표준 면역조직화학을 이용하여 브라질산 주머니쥐 망막을 대상으로 실험하였다. **결과:** 브라질산 주머니쥐 망막에서 calretinin은 일부의 수평세포, AII 무축삭세포, 일부의 신경절세포에서 면역반응성을 보였다. 특히, calretinin 면역반응성을 가지는 모든 AII 무축삭세포는 또 다른 칼슘결합단백질인 parvalbumin을 발현하였다. **결론:** 다른 포유류 망막과 다를 바 없이, 브라질산 주머니쥐 망막에서도 AII 무축삭세포에서 calretinin 면역반응성이 관찰되었다. 이를 통해 calretinin이 브라질산 주머니쥐 망막에서도 AII 무축삭세포의 marker로 이용될 수 있다는 점을 확인하였다.

주제어: 브라질산 주머니쥐, *Monodelphis domestica*, 망막, 칼슘결합단백질, Calretinin, AII 무축삭세포, 면역조직화학법

서 론

칼슘결합단백질(Calcium-binding protein)은 칼슘이온 농도 조절을 기반으로 유도되는 세포 내 신호 전달 과정에서 중요한 역할을 한다.^[1,2] Calbindin D28K, calretinin, parvalbumin은 많이 알려진 EF-hand 칼슘결합단백질로서, 중추신경계의 신경세포집단에 특이적으로 존재한다고 알려져 있으며,^[3] 다른 신경세포의 부분 집단을 구분하는 중요한 marker로도 사용되고 있다.^[3,4] 특히, calretinin은 비타민 D 의존성 칼슘결합단백질로 닭의 망막에서 처음 발견되었으며,^[5] 세포주기정지, 세포자살, 뉴런홍분성조절자의 역할로도 알려져 있다.^[6] 망막에서 calretinin은 뉴런가소성(neuroplasticity)과 연관되어 있다는 연구도 존재한다.^[7] 또한, calretinin을 포함한 칼슘결합단백질의 손상과 결합은 여러 신경 퇴화적 질병과 관련되어 있으며,^[2,6,8-11] 이러한 연구들을 보면 칼슘결합단백질은 중추신경계 내의 신호전달에서 없어서는 안 될 중요한 역할을 수행하고 있음을 알 수 있다.

무축삭세포는 포유류 망막에서 약 30종류로 분류되고 있으며, 내핵층(inner nuclear layer)의 세포 중 약 40%를 차지한다.^[12] 이 중, AII 무축삭세포는 무축삭세포 중 starburst 무축삭세포와 함께 가장 많이 알려져 있다. AII

무축삭세포는 내망상층(inner plexiform layer)에 인접한 내핵층에 존재하며 이들과는 간극 결합으로 모두 연결되어 있다. Narrow-field, bistratified cell의 형태를 보이는 AII 무축삭세포에서, 두꺼운 primary process와 lobular appendage는 sublamina a에 위치하고, arboreal process들은 내망상층의 sublamina b에서 엉켜있는 형태로 존재한다.^[13,14] AII 무축삭세포의 정확한 기능은 완벽히 확립되지 않았지만, 암순응이나 간상세포회로에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 원뿔두극세포와 ON/OFF 간상두극세포를 신경절세포와 서로 연결하는 역할을 수행한다. 또한, AII 무축삭세포는 ON-원뿔두극세포와는 뉴런말단에서 전기적 시냅스를 이루고, OFF-원뿔두극세포와 신경절세포와는 억제성 화학적 시냅스를 이루고 있다.^[15-18] 이러한 관점에서, 무축삭세포에 대한 연구는 시각전달 과정에서 이극세포와 신경절세포 사이 관계를 규명하고 분석하는 과정에서 중요하다.

브라질산 주머니쥐(Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*)는 임신 기간이 비교적 짧고, 한 번에 많은 새끼들을 낳으며 비교적 온순한 성격을 가지는 것이 특징적이다. 이와 같은 장점으로 브라질산 주머니쥐는 실험실 동물모델로 잘 알려져 있고, 여러 분야의 연구에서 사용되어지고 있다.^[19] 특히, 시각계에서 많이 연구됨에 따라,^[20,21] 시각

*Corresponding author: Chang-Jin Jeon, TEL: +82-53-950-5343, E-mail: cjjeon@knu.ac.kr

발생연구에서도 좋은 모델로 여겨지고 있다. 이러한 브라질산 주머니쥐의 망막 외 여러 조직에서 칼슘결합단백질에 대한 연구는 몇 편 발표되었지만,^[22-24] 망막에서의 칼슘결합단백질 발현에 대한 연구는 아직 미미하다.

따라서 이번 연구의 목적은 브라질산 주머니쥐 망막에서의 칼슘결합단백질 calretinin 발현과 시각계의 형태학적 분석을 통해 이 동물의 망막 구조에 대한 이해뿐만 아니라, 이미 연구된 여러 동물과는 어떠한 차이가 있는지에 대한 비교분석, 이해 및 고찰을 하는 데에 있다. 또한, 본 연구는 브라질산 주머니쥐의 시각계에서 신호전달 기작과 망막에서의 칼슘결합단백질의 기능연구에 대한 전망을 밝히는 데 기반이 될 것이다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구에는 총 4마리의 브라질산 주머니쥐(*Monodelphis domestica*)가 사용되었으며, 동물은 아이오와 주립대학(Iowa State University, ISU)에서 공급받았다. 브라질산 주머니쥐의 무게는 약 80-120 g이며, 안구의 지름은 약 7-8mm로 일반 동물실험에 사용되는 생쥐의 안구 크기보다는 훨씬 더 크다. 브라질산 주머니쥐는 남아메리카 산의 작은 유대목 동물로, 현재 여러 장점으로 동물실험모델로 많이 사용되어 지고 있다.^[19] 모든 동물실험과정들은 미국 시각 및 안과학회(ARVO)의 규정을 준수하면서 수행하였으며, 실험동물이 받는 고통뿐만 아니라 실험동물의 수를 최소화하기 위하여 동물이 사용되는 과정에서 특히 노력하였다.

2. 방법

브라질산 주머니쥐를 마취제 케타민(30-40 mg/kg)과 근육이완제인 럼폰(3-6 mg/kg)의 혼합물로 마취한 후, 안구 적출 시 순목반사를 방지하기 위하여 각막에 proparacaine hydrochloride(100-200 µl, Alcon, Seoul, Korea)를 사용하여 추가적으로 국소 마취하였다. 브라질산 주머니쥐는 안구 적출 후 urethane(100 mg/ml, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA)을 사용하여 안락사 시켰다. 적출한 안구로부터 망막을 분리해낸 후, 4% paraformaldehyde(0.1M phosphate buffer, pH 7.40)으로 4-5°C에서 2시간 고정하였다. 이 외 모든 실험 과정에서의 buffer는 phosphate saline buffer(PBS, pH 7.40)를 사용하였다. 망막 조직은 절편하는 방법(절편 조직)과 절편하지 않는 방법(whole mount), 두 가지로 구분하여 진행하였다. 절편 조직은 Vibratome 3000(The Vibratome Company, St Louis, Missouri, USA)을 사용하여 50 µm 두께로 절편하여 얻었으며, calretinin

을 발현하는 세포와 그 세포의 모양을 연구하기 위하여 생쥐에서 생산된 monoclonal anti-calretinin 1차 항체(Chemicon, Temecula, California, USA)를 사용하여 면역조직화학법으로 진행하였다. 모든 조직은 작은 바이알에 처리하려는 용액을 넣어 shaker에서 흔들면서 전 과정을 거쳤다. 절편 조직은 PBS로 10분씩 3번 세척 후, blocking solution(PBS에 0.5% triton X-100 과 4% normal goat serum을 섞은 용액)을 25°C shaker에서 1시간 처리하였다. 그리고 blocking solution에 monoclonal anti-calretinin 1차 항체(1:500, Chemicon)를 넣은 용액을 준비하고 조직을 옮겨 담아 같은 shaker에서 약 24시간동안 조직을 흔들어 주었다. 그 후, 전과 같은 방식으로 조직을 세척 하고 Cy3-conjugated goat anti-mouse 2차 항체(1:200, Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA)가 첨가된 blocking solution을 넣은 용액에 조직을 2 시간동안 반응시켰다. 마지막으로 세척 후 슬라이드글라스(Thermo Fisher Scientific, Seoul, Korea)에 조직을 올려 Vectashield mounting medium(Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)을 떨어뜨린 후, 커버글라스(Thermo Fisher Scientific)를 덮었다.

Calretinin을 발현하는 망막세포의 세밀한 형태관찰과 parvalbumin과의 double-labeling 실험을 위해서 whole mount 조직을 사용하였다. 절편 조직과는 다르게, 면역조직화학법을 하기 전에 얼렸다 녹였다를 반복하는 과정과 1% sodium borohydride(NaBH₄) 처리를 통해 항체 및 용액의 관통을 용이하게 하였다. 그 후 과정은 절편 조직 실험과 비슷하며, 항체를 포함한 blocking solution 처리시간은 절편 조직 실험보다 길게 하였다. 처리 시간을 달리 하는 것은 조직의 종류에 따라 관통하는 시간이 차이가 나는 이유에서이다. Blocking solution은 25°C에서 약 18시간, 1차 항체 처리는 4°C에서 3일, 2차 항체 처리는 4°C에서 하루 동안 조직과 반응시켰다. 또한, double-labeling 실험에서는 polyclonal anti-parvalbumin 1차 항체(1:200, Chemicon)와 이 1차 항체를 탐지하기 위한 fluorescein (FITC)-conjugated anti-rabbit 2차 항체(1:200, Vector Laboratories)를 추가적으로 사용하였다. 그 후 coverslip 과정은 절편 조직과 동일하다. 면역조직화학법을 통해 조직을 염색한 후, Zeiss Axioplan(Ver. 4, Carl Zeiss Meditec Incorporation, Jena, Germany) 현미경과, 공초점 현미경(LSM700; Carl Zeiss)을 이용하여 분석하고 사진 촬영을 하였다.

결 과

브라질산 주머니쥐 망막에서 calretinin을 발현하는 세포

Fig. 1. Calretinin-immunoreactive cells in a 50 μ m vertical section of fluorescence-reacted Brazilian opossum retina. Calretinin stained some horizontal, amacrine and ganglion cells in Brazilian opossum retina. Lobular appendages and dendritic arboreal processes of AII amacrine cells are seen in the inner plexiform layer. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 10 μ m.

Fig. 2. Higher magnification of calretinin-immunoreactive AII amacrine cells in inner plexiform layer of Brazilian opossum retina. Lobular appendages (arrow) and dendritic arboreal processes (arrowhead) of AII amacrine cells are also seen more clearly. Scale bar = 10 μ m.

의 종류를 알아보기 위하여 이를 특이적으로 염색할 수 있는 anti-calretinin 1차 항체와 이 항체를 탐지하기 위한 Cy3-conjugated 2차 항체를 사용하였다. Fig. 1은 브라질산 주머니쥐 망막을 50 μ m 두께로 수직 절편한 조직에서 calretinin 면역반응성을 가지는 세포이다. Calretinin 면역반응성은 내핵층의 무축삭세포에서 뚜렷하게 관찰되었고, 일부의 수평세포와 일부의 신경절세포에서도 관찰되었다.

Fig. 3. Calretinin-immunoreactive cells in fluorescence-reacted a whole mount of Brazilian opossum retina. (A) Calretinin immunoreactivity in the inner nuclear layer. (B) The focus is on the upper part of the inner plexiform layer and shows the primary dendrites extending from the cell body referred as lobular appendages. (C) The focus is on the calretinin-immunoreactive tier in the lower inner plexiform layer and shows the dendritic arboreal processes. (D) Calretinin immunoreactivity in the ganglion cell layer. Some ganglion cells and nerve fibers are seen in the Brazilian opossum retina. Scale bar = 10 μ m.

특히, calretinin이 염색한 무축삭세포가 AII 무축삭세포의 형태와 굉장히 유사함을 보고, 이를 확실히 하기 위하여 고배율로 관찰하였다(Fig. 2). Fig. 2A와 2B는 모두 anti-calretinin 1차 항체로 염색한 세포들이며, 그의 형태적 모습을 보았을 때 확실히 AII 무축삭세포로 추정된다. 이들은 AII 무축삭세포가 가지는 형태적 특징인 lobular appendage(Fig. 2에서의 화살표표시)와 dendritic arboreal process(Fig. 2에서의 화살표 머리표시)들을 뚜렷하게 보여주고 있다. Fig. 2B에서는 calretinin 면역반응성을 가지는 일부의 신경절세포도 보여주고 있다.

Whole mount 조직에서 calretinin 면역반응성을 가지는 세포들을 공초점 현미경을 이용하여 더욱 정밀히 관찰해 보면, AII 무축삭세포의 층 깊이에 따른 형태적 차이를 관찰할 수 있다(Fig. 3). Fig. 3A는 AII 무축삭세포의 cell body mosaic이다. Cell body 사이의 간격을 살펴보면 그리 넓지도 조밀하지도 않으며, 약간의 lobular appendage 또한 관찰할 수 있다. Fig. 3B는 내핵층에 가까운 내망상층에서 초점을 맞춰 찍은 사진으로 AII 무축삭세포의 lobular appendage를 뚜렷하게 보여준다. 몇 개의 cell

Fig. 4. Confocal micrographs from whole mount Brazilian opossum retina with anti-calretinin (A) and anti-parvalbumin (B). All calretinin-immunoreactive AII amacrine cells in inner nuclear layer were labeled with parvalbumin (C). Scale bar = 50 μ m.

body 또한 관찰되지만, AII 무축삭세포의 특징적인 lobular appendage가 아주 뚜렷하게 관찰되었다. 내망상층 내에서 신경절세포층에 가까운 곳에는 dendritic arboreal process들이 존재한다(Fig. 3C). 이는 AII 무축삭세포의 매우 잘 알려진 또 다른 형태적 특징이며, 그 모습은 정교하기보다는 굉장히 복잡하게 엉켜있다. 마지막으로, Fig. 3D는 calretinin 면역반응성을 가지는 일부 신경절세포의 모습을 보여준다. 사진에서 보이는 것과 같이, calretinin의 면역반응성은 일부 신경절세포 뿐만 아니라 신경절세포가 이루는 시신경에서도 나타났다. 이러한 본 연구의 결과를 통하여 브라질산 주머니쥐 망막에서 특정 세포들은 calretinin 면역반응성을 가지고, 그 중 AII 무축삭세포가 우세하며, 일부의 수평세포와 일부의 신경절세포에서도 발현하는 것을 알 수 있다.

브라질산 주머니쥐 망막에서 calretinin 면역반응성을 가지는 AII 무축삭세포가 parvalbumin도 발현하는지에 대해 알아보기 위하여, whole mount 조직을 이용하여 parvalbumin과 double-labeling 실험을 하였다. Fig. 4는 AII 무축삭세포의 cell body에 초점을 맞추고 calretinin과 parvalbumin 면역반응성을 비교한 사진이다. 그 결과, 브라질산 주머니쥐 망막에서 calretinin 면역반응성을 가지는 모든 AII 무축삭세포들은 parvalbumin 면역반응성도 가지는 것으로 관찰되었다.

고 찰

본 연구에서는 발생학적 생장을 비롯한 다수의 장점으로 인해 동물모델로 많이 사용되어지고 있는 브라질산 주머니쥐의 중추신경계를 이해하기 위하여, 칼슘결합단백질의 한 종류인 calretinin에 대하여 브라질산 주머니쥐 대상으로 실험을 수행하였다. 그 결과, 브라질산 주머니쥐 망

막의 내핵층에 AII 무축삭세포로 추정되는 세포가 존재하는 것을 발견하였고, 이 세포들은 anti-calretinin 항체로 뚜렷하게 염색되었다. 이들의 세포가 AII 무축삭세포임을 확정짓기 위하여, 본 연구에서는 절편 조직과 whole mount를 이용한 실험을 통해 분석하였다. AII 무축삭세포의 형태학적 특성에 대해 연구된 많은 결과와 비교해보았을 때,^[13-15] 두 종류의 조직 모두에서 AII 무축삭세포라 할 수 있는 특징이 관찰되었다. 절편 조직에서는 AII 무축삭세포의 큰 형태적 특징인 lobular appendage와 dendritic arboreal process들이 뚜렷하게 관찰되었고, whole mount 조직에서도 이러한 모습을 관찰할 수가 있었다.

브라질산 주머니쥐 망막을 대상으로 한 본 연구는, anti-calretinin 항체가 망막의 AII 무축삭세포를 염색할 수 있다는 보고된 많은 연구 결과와 크게 다르지 않았다.^[25,26] 즉, 브라질산 주머니쥐 망막에서 calretinin이 일부 수평세포와 AII 무축삭세포, 일부 신경절세포에 발현하는 결과는 고양이와 개의 망막에서도 동일하게 나타난 바가 있다.^[25] 하지만 같은 포유류에 속하는 동물임에도 불구하고 토끼에서는 수평세포의 calretinin 면역반응성 결과가 달랐다.^[25] 토끼에서는 AII 무축삭세포, 일부 신경절세포에서 calretinin이 발현하였지만, 수평세포는 calretinin 면역반응성을 가지지 않았으며, 이러한 토끼 망막 내의 calretinin 면역반응성 결과는 박쥐 망막에서도 동일했다.^[26]

여러 척추동물망막에서 비교해보면 종마다의 면역반응성을 가지는 세포의 종류는 조금씩 차이가 있지만, calretinin에 의해 AII 무축삭세포가 표지된다는 결과는 이미 많이 알려져 있다.^[13,14,17,25,26] 하지만, 모든 동물에서 calretinin 면역반응성을 가지는 AII 무축삭세포가 존재하는 것은 아니다. 특히, 올빼미와 생쥐 망막에서는 calretinin 면역반응성을 가지는 AII 무축삭세포가 존재하지 않았다.^[27,28] 척추동물들 사이에서도 calretinin 면역반

응성이 차이나는 이유는 종 특이성에 의한 AII 무축삭세포의 다양한 기능을 암시한다.

반면, AII 무축삭세포를 표지할 수 있는 단백질이 parvalbumin이 될 수도 있다는 연구도 다수 존재한다.^[4,13,14,26,27,29,30] Parvalbumin은 칼슘결합단백질 중 가장 먼저 알려진 단백질로, 한 척추동물의 골격근에서 발견되었으며,^[31] 현재까지 많은 동물에서 parvalbumin을 발현하는 AII 무축삭세포가 연구되었다.^[32] 또한, 많은 척추동물망막 중 calretinin과 parvalbumin 모두가 AII 무축삭세포를 표지할 수 있다는 연구도 다수 존재한다. 예를 들어, 쥐, 토끼, 고양이, 박쥐에서는 calretinin 뿐만 아니라, parvalbumin도 AII 무축삭세포에 면역반응성을 가지며,^[13,14,25,29] 종들 간의 각 단백질에 대한 면역반응성의 차이는 존재한다. 특히, 박쥐에서는 몇 개의 작은 세포를 제외하고는 calretinin 면역반응성을 가지는 거의 모든 세포들이 parvalbumin 면역반응성도 가졌다.^[26] 본 연구에서도 두 단백질에 의해 AII 무축삭세포가 표지되었을 뿐만 아니라, calretinin 면역반응성을 가지는 모든 AII 무축삭세포 세포들이 parvalbumin에 의해서도 면역반응성을 가졌다. 이러한 결과는 브라질산 주머니쥐 망막의 AII 무축삭세포를 염색할 수 있는 marker로서 calretinin뿐만 아니라 parvalbumin도 동시에 사용될 수 있음을 의미한다.

AII 무축삭세포는 내망상층 ON과 OFF층 모두에서 정밀하게 시냅스를 형성하고, 원뿔두극세포와 간상두극세포로부터 오는 신경전달신호에 관여하여 망막에서 명반응회로 뿐만 아니라 암반응회로에서도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^[33-35] 즉, 다른 척추동물과 비슷하게 브라질산 주머니쥐에서도 이러한 기능을 AII 무축삭세포가 하고 있으며, calretinin이 이러한 기능과 크게 연관되어 있다고 볼 수 있다. Calretinin을 포함한 칼슘결합단백질은 칼슘매개-신호전달에서 큰 역할을 한다고 알려져 있지만, 아직 그 기능은 정확히 밝혀지지 않았다.^[1,2] 그 중, calretinin은 중추신경계에서 자극적 input을 조절하거나,^[36] 안구의 움직임에 관여하는 운동신경,^[37] 세포주기조절 등에서도 큰 역할을 한다고 알려져 있다.^[6] 특히, 망막에서는 뉴런가소성(neuroplasticity)과 밀접한 관계가 있다고도 알려져 있다.^[7] 따라서, 이러한 calretinin을 포함한 칼슘결합단백질의 손상은 알츠하이머나 파킨슨씨병 등의 치명적인 신경퇴행성 질환을 야기하며,^[1,2,8-11,38-42] 이를 통해 칼슘결합단백질이 중추신경계에서 중요한 역할을 하는 것이 분명함을 알 수 있다.

따라서 본 연구의 결과는 망막 내 칼슘결합단백질로는 아직 많이 연구되어 있지 않은 브라질산 주머니쥐에서 망막 내 calretinin 면역반응성을 갖는 AII 무축삭세포를 관찰함으로써 앞으로의 브라질산 주머니쥐 망막에서의 중추

신경계 이해와 칼슘결합단백질의 역할 연구에 크게 기여할 것이다.

결론

본 연구에서는 브라질산 주머니쥐 망막에서 일부의 수평세포, AII 무축삭세포, 일부 신경절세포가 calretinin 면역반응성을 가지는 것을 확인하였다. 특히, 내핵층에서 모든 AII 무축삭세포가 calretinin 면역반응성을 가지는 것이 특징적이었고, 이러한 세포들이 모두 parvalbumin에 대해서도 면역반응성을 가졌다. 이러한 점을 종합해볼 때, 브라질산 주머니쥐 망막에서 calretinin은 parvalbumin과 함께 AII 무축삭세포를 표지할 수 있는 marker로 사용될 수 있다. 이와 같은 연구는 망막 내에서 발현하는 칼슘결합단백질의 연구가 미미한 특정 척추동물의 중추신경계를 이해하는 데 의의가 있다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2013R1A1A2059568).

REFERENCES

- [1] Polans A, Baehr W, Palczewski K. Turned on by Ca^{2+} ! The physiology and pathology of Ca^{2+} -binding proteins in the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19(12):547-554.
- [2] Schfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(4):134-140.
- [3] Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1992; 15(8):303-308.
- [4] Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* 1990;35(2):375-475.
- [5] Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol.* 1987;105(3):1343-1353.
- [6] Palczewski K, Plans AS, Baehr W, Ames JB. Ca^{2+} -binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioessays.* 2000;22(4): 337-350.
- [7] Camp AJ, Wijesinghe R. Calretinin: modulator of neuronal excitability. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(11): 2118-2121.
- [8] Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E et al. Calretinin interneurons are early targets of extracellular

- amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.* 2010;21(1):119-132.
- [9] Barraclough R. Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochem Biophys Acta.* 1998;1448(2):190-199.
- [10] Heizmann CW, Braun K. Calcium regulation by calcium-binding proteins in neurodegenerative disorders. 1st ed. New York: Springer-Verlag, 1995.
- [11] Leuba G, Kraftsik R, Saini K. Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D28K immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol.* 1998;152(2):278-291.
- [12] Masland RH. Neuronal cell types. *Curr Biol.* 2004;14(13):497-500.
- [13] Wssle H, Grnert U, Rhrenbeck J. Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *J Comp Neurol.* 1993;332(4):407-420.
- [14] Casini G, Rickman DW, Brecha NC. AII amacrine cell population in the rabbit retina: identification by parvalbumin immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 1995;356(1):132-142.
- [15] Vaney DI, Gynther IC, Young HM. Rod-signal interneurons in the rabbit retina: 2. AII amacrine cells. *J Comp Neurol.* 1991;310(2):154-169.
- [16] Strettoi E, Raviola E, Dacheux RF. Synaptic connections of the narrowfield, bistratified rod amacrine cell (AII) in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 1992;325(2):152-168.
- [17] Wässle H, Grnert U, Chun MH, Boycott BB. The rod pathway of the macaque monkey retina: identification of AII-amacrine cells with antibodies against calretinin. *J Comp Neurol.* 1995;361(3):537-551.
- [18] Kolb H. Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. *Eye (Lond).* 1997;11(6):904-923.
- [19] VandeBerg JL, Robinson ES. The laboratory opossum (*Monodelphis Domestica*) in laboratory research. *ILAR J.* 1997;38(1):4-12.
- [20] Kahn DM, Huffman KJ, Krubitzer L. Organization and connections of V1 in *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol.* 2000;428(2):337-354.
- [21] Taylor JS, Guillery RW. Early development of the optic chiasm in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol.* 1994;350(1):109-121.
- [22] Klejbor I, Ludkiewicz B, Wojcik S, Turlejski K. Correlation between dopaminergic phenotype and expression of calretinin in the midbrain nuclei of the opossum (*Monodelphis domestica*): an immunohistological study. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2013;73(4):529-540.
- [23] Jia C, Halpern M. Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Morphol.* 2004;259(3):271-280.
- [24] Domaradzka-Pytel B, Majak K, Spodnik J, Olkowicz S, Turlejski K, Djavadian RL et al. Distribution of the parvalbumin, calbindin-D28K and calretinin immunoreactivity in globus pallidus of the Brazilian short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67(4):421-438.
- [25] Jeon MH, Jeon CJ. Immunocytochemical localization of calretinin containing neurons in retina from rabbit, cat, and dog. *Neurosci Res.* 1998;32(1):75-84.
- [26] Jeon YK, Kim TJ, Lee JY, Choi JS, Jeon CJ. AII amacrine cells in the inner nuclear layer of bat retina: identification by parvalbumin immunoreactivity. *Neuroreport.* 2007;18(11):1095-1099.
- [27] Sanna PP, Keyser KT, Celio MR, Karten HJ, Bloom FE. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the vertebrate retina. *Brain Res.* 1993;600(1):141-150.
- [28] Haverkamp S, Wssle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol.* 2000;424(1):1-23.
- [29] Gbriel R, Straznicky C. Immunocytochemical localization of parvalbumin- and neurofilament triplet protein immunoreactivity in the cat retina: colocalization in a subpopulation of AII amacrine cells. *Brain Res.* 1992;595(1):133-136.
- [30] Sanna PP, Keyser KT, Deerink TJ, Ellisman MH, Karten HJ, Bloom FE. Distribution and ontogeny of parvalbumin immunoreactivity in the chicken retina. *Neuroscience.* 1992;47(3):745-751.
- [31] Heizmann CW. Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia.* 1984;40(9):910-921.
- [32] Bennis M, Versaux-Botteri C, Reprant J, Armengol JA. Calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the retina of the chameleon (*Chamaeleo chamaeleon*). *Brain Behav Evol.* 2005;65(3):177-187.
- [33] Chun MH, Han SH, Chung JW, Wssle H. Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina. *J Comp Neurol.* 1993;332(4):421-432.
- [34] Dacheux RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci.* 1986;6(2):331-345.
- [35] Famiglietti EV Jr, Kolb H. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* 1975;84(2):293-300.
- [36] Abuhamed MM, Bo X, Alsharafi WA, Jing L, Long L, Zhiguo W et al. Changes in the numbers and distribution of calretinin in the epileptic rat hippocampus. *Neurosciences (Riyadh).* 2010;15(3):159-166.
- [37] Zehe C, Hess BJ, Horn AK. Calretinin inputs are confined to motoneurons for upward eye movements in monkey. *J Comp Neurol.* 2013;521(14):3154-3166.
- [38] Byun K, Kim D, Bayarsaikhan E, Oh J, Kim J, Kwak G et al. Changes of calcium binding proteins, c-Fos and COX in hippocampal formation and cerebellum of Niemann-Pick, type C mouse. *J Chem Neuroanat.* 2013;52:1-8.
- [39] Hayashi S, Amari M, Okamoto K. Loss of calretinin- and

parvalbumin-immunoreactive axons in anterolateral columns beyond the corticospinal tracts of amyotrophic lateral sclerosis spinal cords. J Neurol Sci. 2013;331(1-2):61-66.

[40] Hurley MJ, Brandon B, Gentleman SM, Dexter DT. Parkinson's disease is associated with altered expression of CaV1 channels and calcium-binding proteins. Brain. 2013; 136(7):2077-2097.

[41] Kim JE, Kwak SE, Kim DS, Won MH, Kwon OS, Choi

SY et al. Reduced calcium binding protein immunoreactivity induced by electroconvulsive shock indicates neuronal hyperactivity, not neuronal death or deactivation. Neuroscience. 2006;137(1):317-326.

[42] Sokal I, Li N, Verlinde CL, Haeseleer F, Baehr W, Palczewski K. Ca⁽²⁺⁾-binding proteins in the retina: from discovery to etiology of human disease(1). Biochim Biophys Acta. 2000;1498(2-3):233-251.

Identification of Calretinin-immunoreactive AII Amacrine Cells in the Brazilian Opossum (*Monodelphis domestica*)

Se-Jin Jeong^{1,2} and Chang-Jin Jeon^{1,2,*}

¹School of Life Sciences, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

²BK21 Plus KNU Creative BioResearch Group, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

(Received May 19, 2014; Revised June 12, 2014; Accepted June 18, 2014)

Purpose: The purpose of this study was to investigate the immunoreactivity of calretinin in Brazilian opossum (*Monodelphis domestica*) retina. Calcium-binding protein calretinin is known to play a key role in calcium-mediated signal transduction. **Methods:** Experiments have been performed by standard immunocytochemical techniques on retina of the Brazilian opossum. **Results:** Calretinin-immunoreactivity was exhibited within the horizontal subpopulations, AII amacrine and ganglion cell subpopulations in the Brazilian opossum retina. Especially, all calretinin-immunoreactive AII amacrine cells also expressed parvalbumin. **Conclusions:** Similar to other mammalian retinas, calretinin-immunoreactivity was also observed within the AII amacrine cells in the Brazilian opossum retina. Thus, calretinin can be a marker of AII amacrine cells in the Brazilian opossum retina.

Key words: Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*, Retina, Calcium-binding protein, Calretinin, AII amacrine cell, Immunocytochemistry