

흰쥐 안구적출에 따른 위둔덕 calretinin 발현의 변화

윤상필, 김한용¹, 전영진², 장인엽^{3,4}

서남대학교 의과대학 해부학교실,

¹서남대학교 의과대학 성형외과학교실, ²조선대학교 의과대학 약리학교실,

³조선대학교 의과대학 해부학교실, ⁴조선대학교 단백질소재 연구센터

간추림 : 위둔덕얇은층은 망막, 시각결절, 뇌줄기 신경핵 등에서 오는 들신경섬유들을 받아들여 시각자극에 대한 반응, 습관적인 행동, 유해자극에 대한 반사 등에도 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다.

어린 흰쥐의 한쪽 안구적출에 따라 나타나는 위둔덕얇은층의 변화를 알아보기 위해 망막-위둔덕 신경추적자와 칼슘결합단백질의 하나인 calretinin의 발현 양상을 면역조직화학염색을 실시하였다.

출생 직후 흰쥐의 망막-위둔덕 투사섬유들은 대부분 반대쪽 위둔덕얇은층에 도달하는 것을 알 수 있었다. 안구적출쪽 위둔덕의 calretinin 발현은 calretinin 양성세포들이 띠층, 얇은회색층, 시신경층 등에 산재해 있었고, calretinin 양성신경섬유들이 위둔덕얇은층에서 진하게 염색되는 양상을 보였다. 안구적출 반대쪽 위둔덕얇은층의 calretinin 양성세포들은 적출쪽에 비해 현저히 증가하였고, calretinin 양성섬유들의 염색성은 감소하였다.

안구적출에 의해 망막-위둔덕 경로가 차단됨에 따라 위둔덕얇은층의 calretinin 양성세포들의 증가와 calretinin 양성섬유의 감소가 나타나는데, 이는 위둔덕신경세포들의 재구축과 관련된 것으로 보인다.

찾아보기 낱말 : calretinin, 위둔덕, 안구적출, 흰쥐

서론

위둔덕 (superior colliculus, SC)은 층판구조로 되어있으며, 형태학적으로 여러 세포형태로 구성되어 있는 부위이다. 위둔덕은 7층으로 구성되어있는데 이들은 세포층과 신경섬유층으로 구분되고, 다시 기능적으로 얇은층과 깊은층으로 나누어진다 (Harting 등 1973, Kanaseki와 Sprague 1974, Huerta와 Harting 1983). 얇은층은 띠층 (stratum zonale : SZ), 얇은회색층 (stratum griseum superficiale : SGS), 시신경층 (stratum opticum : SO)으로 구성되고, Golgi 염색을 이용하여 염색하여 보면 여러 신경세포들이 복잡하게 존재하는 것으로 알려지고 있다 (Langer와 Lund

1974, Tokunaga와 Otani, 1976). 기능적으로 위둔덕 얇은층은 망막, 시각결절에서 오는 중요한 들신경섬유를 비롯하여 시각자극에 반응하는 여러 신경핵으로부터 오는 들섬유들이 온다 (Drager와 Hubel, 1976). 위둔덕깊은층은 중간회색층 (stratum griseum intermedium : SGI), 중간백색층 (stratum album intermedium : SAI), 깊은회색층 (stratum griseum profundum : SGP), 깊은백색층 (stratum album profundum : SAP)으로 구성되고, 주요 들신경섬유는 흑색질, 뇌줄기 여러 부위, 눈동자 움직임에 관여하는 신경핵 등에서 기원하는 것으로 알려지고 있으며, 습관적인 행동, 유해자극에 대한 반사 등에도 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다 (McHaffie와 Stein 1982, Dean 등 1982).

Calbindin, parvalbumin, calretinin들은 대표적인 칼슘결합단백질 (calcium-binding proteins : CaBP)로 알려져 있으며 중추신경계에서 신경세포의 생존, 보

*이 논문은 2004년도 조선대학교 연구보조비 지원에 의하여 연구되었음

교신저자: 장인엽 (조선의대 해부학교실)

전자우편: iyjang@mail.chosun.ac.kr

호, 영양, 재생, 발생 및 분화 등 여러 가지 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려지고 있다(Hendry 등 1989, Braun 1990, Baimbridge 등 1992, Andressen 등 1992). 이들은 망막(Pasteels 등 1990), 가쪽무릎핵(lateral geniculate nucleus; Demeulemeester 등 1991), 시각결절(Hendry 등 1989), 덮개앞부위(preteectum; Nabors와 Mize, 1991), 위둔덕(Mize 등 1991) 등의 시각계통에서도 널리 존재하지만, 이들의 기능은 정확히 정립되어있지 않고, 단순히 시각계통에서 칼슘연관성 세포내 신호전달 과정과 세포보호에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다(Rogers 등 1987, Polans 등 1996).

특히 시각경로가 차단되었을 때 위둔덕에서 이들 칼슘결합단백질의 분포가 변화하는 것으로 알려지고 있으며, 동물에 따른 차이, 또는 가쪽무릎핵과 위둔덕간의 차이 등을 보이는 것으로 알려지고 있다. 이러한 칼슘결합단백질의 변화는 시각경로의 변화에 따라 신경조직에서 나타나는 보호작용 및 적응양상으로 여겨지고 있다(Mize 등 1992a, b, Arai 등 1993, Gobersztejn과 Britto 1996, Jeon과 Jeon 1998). 시각경로에서 칼슘결합단백질 중 calbindin과 parvalbumin에 대한 연구는 많이 이루어진 반면, calretinin에 대한 보고는 많지 않은 실정이다. 따라서 본 실험에서는 흰쥐를 실험재료로 신경추적자 방법을 이용하여 망막-둔덕 경로를 알아내고, 한쪽 안구적출에 의해 망막위둔덕연결을 차단 후 나타나는 위둔덕얕은층의 calretinin함유 신경세포들의 변화양상을 밝혀내고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 수술적 처치

Sprague Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 위둔덕 calretinin의 변화를 보기위해 출생 2일 이내의 어린 쥐 8마리를 얼음주머니위에 놓고 눈꺼풀을 절개한 후, 안구주위 근육과 피부들을 제거하고, 시신경을 절제한 다음, 안구를 적출하였다. 안구적출 후 다시 어미에게 되돌아가게 하여 4주 후에 희생시켰다. 또 망

막-위둔덕 신경로를 추적을 보기위하여 출생 2일 이내 흰쥐 3마리에 전기생리학에서 사용하는 모세유리관을 이용하여 0.2% cholera toxin (Sigma) 10 μ L를 한쪽 눈안에 주입하고 48시간 후에 희생시켰다.

2. 뇌의 고정과 표본제작

흰쥐를 희생시킨 후 4% paraformaldehyde를 사용하여 관류고정 후 재차 4°C에서 12시간 정도 고정하였다. 냉동조직절편을 만들기 위해 30% sucrose (Sigma)가 함유된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 담귀 4°C에서 2~3일간 보관하여 냉동손상을 방지하였다. 냉동절편기 (Reichert-Jung)를 사용하여 30~40 μ m 두께로 자른 절편들을 glycerol, ethylene glycol, 증류수, PBS 등이 들어 있는 보관용액 (용적비율 3:3:3:1)에 일단 저장하였다가 필요한 부위 절편들을 염색에 이용하였다. Cresyl violet 염색을 실시하여 중추신경계의 위치를 파악한 후 면역조직화학염색을 실시하였다. Cholera toxin을 주입한 쥐도 동일한 방법으로 처리하였다.

3. 면역조직화학염색

면역조직화학염색과정은 아래와 같이 실시하였다. 절편을 PBS에 30분간 수세한 후, 내인성 산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% H₂O₂로 20분 동안 반응시킨 다음, 재차 PBS로 3회 이상 세척하였다. 비특이성 반응을 억제하기 위해 1% bovine serum albumin (BSA)이 들어있는 PBS에서 1시간 동안 진동시키며 반응시켰다. 제 1차 항체는 토끼에서 추출한 anti-calretinin (Sigma)과 anti-cholera toxin (Sigma)을 각각 1:500으로 희석하여 4°C에서 48시간 진동시키며 반응시킨 다음, PBS로 수차례 세척하여 잔여 항체를 제거하고, biotin이 붙어있는 2차 항체 (Vector) 또는 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate anti-rabbit IgG (Vector)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 형광염색은 습윤봉입하고, biotin이 붙어있는 2차 항체를 사용한 경우는 avidin-biotin complex를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 발색은 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 10

mg/40 mL PBS, Sigma)를 사용하였으며, 광학현미경 하에서 발색정도를 확인한 후, 탈수, 투명 과정을 거친 후 Polymount (Polyscience)에 봉입하였다. 항체의 특이성 정도를 파악하기 위해 제 1차 항체 대신에 PBS를 사용하여 같은 방식으로 실험하였다. 면역형광염색된 조직표본은 공초점레이저주사현미경 (FV300, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로는 488 nm 파장을 FITC 용으로, 568 nm 파장을 Texas-red 용으로 사용하였다. Flow View Softwave program (Olympus, Japan)을 사용하여 영상을 얻었다.

4. 계수 및 통계처리

3마리의 실험군에서 위둔덕의 중간부위 3절편을 선택하여 위둔덕얇은층에 나타나는 calretinin양성세포들을 현미경에서 계수하였다. 절편마다 같은쪽위둔덕(정상)과 반대쪽위둔덕(실험군)을 각각 계수하여 이를 합산하였다. 같은쪽위둔덕과 대조군위둔덕에서 계수한 숫자를 비교한 결과, 차이가 없어 같은쪽위둔덕을 대조군으로 사용하였다. 실험군 calretinin양성세포들의 숫자는 대조군에 대한 비율(%)로 처리하였으며 이는 paired t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

결 과

1. 위둔덕에 나타나는 cholera toxin 반응

한쪽 안구에 주입된 cholera toxin에 의한 신경추적 결과, 주입된 반대쪽 위둔덕얇은층에서 강한 반응을 관찰할 수 있었고, 같은 쪽에서는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1).

2. 위둔덕에서 calretinin양성세포의

면역조직화학적 소견

대조군의 위둔덕얇은층에 나타나는 calretinin양성세포들의 모양은 두극세포, 별세포, 못극세포 등 다양하였지만, 주로 못극세포였으며, 가지돌기들의 염

Table 1. Number of calretinin-immunoreactive cell

	Cell numbers	
	Ipsilateral to enucleation	Contralateral to enucleation
Rat 1	35	223
	39	229
	36	224
Rat 2	36	219
	40	226
	37	223
Rat 3	34	220
	37	227
	36	223
Total	330	2014

Four weeks after monocular eye enucleation (n = 3), the number of calretinin-immunoreactive cell bodies in the superficial layers of the superior colliculus was increased on the contralateral side. Cell counts were made from three sections of each unilaterally eye-enucleated rat.

색은 잘 되지 않았고, 가지돌기들은 주로 관상절편의 수평방향으로 진행하였다. 대조군의 위둔덕얇은층에 나타나는 calretinin양성세포들은 적은 수가 띠층, 얇은회색층, 시신경층 등에 산재해 있었다(Figs. 2~4). 대신 신경섬유들이 서로 calretinin에 진하게 염색되는 양상을 보였다. 안구적출반대쪽의 위둔덕얇은층에서는 대조군에서 볼 수 없었던 위둔덕얇은층, 특히 얇은회색층과 시신경층에 많은 calretinin양성세포들이 출현함(안구적출쪽 330개, 안구적출반대쪽 2014; $p < 0.001$)을 관찰할 수 있었다(Figs. 2, 3; Table 1). 안구적출반대쪽에 나타나는 calretinin양성세포들의 모양은 대부분 못극세포였으며, 가지돌기들은 수평 및 수직방향으로 잘 염색되었다(Fig. 4b). Calretinin양성 세포수가 안구적출반대쪽에서 현저히 증가한 반면, calretinin양성섬유들의 염색성은 실험군 위둔덕에서 대조군에 비해 감소하였다(Figs. 3, 4).

고 찰

본 실험에서는 cholera-toxin을 이용한 흰쥐의 망막-위둔덕신경로의 추적과 어린 흰쥐의 한쪽 안구적출에 따른 위둔덕얇은층의 변화를 칼슘결합단백질의 하나인 calretinin을 통하여 발현양상을 알아보

았다. 한쪽 눈에 주입된 cholera-toxin은 대부분 반대쪽 위둔덕얇은층에서 관찰되었으며, 같은쪽 위둔덕에서는 거의 관찰되지 않았다.

안구적출에 의해 위둔덕얇은층의 calretinin양성반응 양상은 매우 현저한 변화를 보였다. 이러한 반응은 시야결손에 따른 위둔덕 calretinin 염색반응의 변화 또는 출생 직후에 위둔덕시신경층에 나타나는 세포들의 재구축에 의한 것으로 사료된다(Giordano 등 1980, Finlay 등 1986). 반대쪽 위둔덕얇은층에서 calretinin양성섬유들의 감소를 보이는 것은 흰쥐는 망막으로부터 오는 calretinin양성 수입성섬유가 많이 존재한다는 것으로 추측되는데, 이는 많은 수의 calretinin양성 망막신경세포가 존재한다는 사실에 의해 뒷받침되고 있다(Jeon과 Jeon 1998). calretinin양성섬유의 감소를 보인 본 실험 소견은 Kang 등 (2002)이 햄스터를 대상으로 반대쪽 calretinin양성 신경섬유들이 거의 소실된다는 보고와는 차이가 있었다. 이러한 소견은 흰쥐 위둔덕 얇은층의 calretinin양성신경섬유들의 대부분은, 햄스터에 비해 정도는 낮지만, 망막으로부터 오고, 나머지는 뇌의 다른 부위에서 이곳으로 투사되는 것으로 추측된다. 이러한 calretinin양성신경섬유들의 감소는 시신경성 들섬유들의 절단에 의해 영향을 받은 것으로 사료되나, 더욱 정확한 원인은 장차 cholera toxin 과의 이중염색 등의 방법으로 밝혀내야 할 것 같다.

Calretinin양성섬유의 감소와는 다르게 반대쪽 위둔덕에서, calretinin양성세포들은 오히려 증가하였는데, 이러한 소견은 흰쥐(Arai 등 1993), 생쥐(Gobersitein과 Britto 1996), 햄스터(Kang 등 2002) 등의 보고와 일치하였다. Calretinin양성세포들의 증가는 위둔덕얇은층, 특히 얇은회색층과 시신경층에서 주로 관찰되었는데 이러한 본 실험의 소견은 다른 보고들과 거의 일치하였다(Arai 등 1993, Kang 등 2002). 반대쪽 위둔덕에서 새로운 calretinin양성세포들의 출현은 안구적출로 망막에서 오는 수입섬유들이 차단됨에 따라서 calretinin양성신경세포들의 보충이 이루어지거나, 신경연결의 변화에 따른 신경세포들의 재구축이 일어나는 것으로 사료된다. Winsky와 Jacobowitz (1995)가 한쪽 속귀과괴에 의해 달팽이 핵에서 calretinin mRNA가 증가한다는 사실로 보아

본 실험 경우에서도 비슷한 양상으로 추측된다. 한편 토끼의 위둔덕에 나타나는 calretinin염색반응은 다른 동물들과는 달리, 정상 위둔덕얇은층에 많은 calretinin양성신경세포들이 존재하고, 신경얼기를 형성하지 않고, 또한 안구적출에 의해 반대쪽 위둔덕의 변화가 나타나지 않는다고 보고되고 있다(Jeon과 Jeon 1998). 이러한 결과들로 보아 종에 따라 망막으로부터 오는 섬유가 투사되는 위둔덕 calretinin의 분포 및 기능이 많은 차이를 보이는 것으로 사료되지만, 기능적인 중요성은 아직 정확하게 알려진 바가 없다.

Calretinin은 calmodulin superfamily의 하나로 29 kD 신경단백질을 encoding한다는 것이 망막에서 처음으로 확인되었다. 4개의 칼슘과 결합하는 부위를 가지고 있으며, calbindin과 약 58%의 구조적 동일성(homology)을 가지는 것으로 알려지고 있다(Rogers 1987). 이러한 구조적 유사성에 비추어 calbindin과 calretinin은 각기 다른 신경세포에서 서로 비슷한 기능을 수행하고 있는 것으로 추측되고 있다.

칼슘은 축삭전도, 신경전달물질의 방출, 여러 자극에 대한 반응 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세포내 칼슘농도의 변화가 신경세포의 전달과정에 필수적이므로, calretinin이 다른 칼슘결합단백질들과 같이 세포내 칼슘농도 완충작용을 통해 전기적 자극의 전도를 조절하는 것으로 여겨진다(Rogers 1987).

칼슘결합단백질은 중추신경계에서 신경세포보호에 있어서 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려지고 있다(Mattson 등 1991, Heinzmann과 Braun 1995, D'Orlando 등 2001). 또 안플 털감각세포 손상모델에서 이들 세포의 재생에 calretinin이 관련되어있고(Zheng과 Gao 1997), 말초신경재생과정에서 calretinin이 작용하는 등 신경의 재생에 관여한다고 알려지고 있다(Hiroshima 등 1998).

안구적출에 의해 망막-위둔덕 신경경로가 차단됨에 따라 calretinin의 발현이 현저히 증가하는 변화를 보였는데, 다른 칼슘결합단백질인 calbindin과 parvalbumin의 경우에는 오히려 감소한다고 보고되고 있다(Lane 등 1996, Jeon과 Jeon 1998, Kang 등 2002). Huntington씨 병을 유발시킨 흰쥐에서 cal-

bindin과 huntingtin이 줄무늬체의 신경세포에서 함께 발현되지만, 사이신경세포의 calretinin 발현은 huntingtin과 전혀 무관하다고 보고되고 있다 (Kosinski 등 1997). 또 심장정지 후 소생시킨 모델에서 시상그물핵의 parvalbumin 양성세포들은 대부분 소실되지만, calretinin 양성세포들은 살아남은 세포에서 발현된다고 한다 (Kawai 등 1995). 위와 같이 상황에 따라 칼슘결합단백질의 발현이 각각 달라지는 것처럼 본 실험과 같이 위둔덕에서 나타나는 calretinin 발현의 변화는 보호기능, 신경재구축에 관련이 있는 것으로 추측된다. 각각의 칼슘결합단백질들이 각기 다르게 발현되어 작용을 나타내는 것으로 알려지고 있지만 이들에 조절작용은 아직 정확히 밝혀지지 않고 있어 이에 대한 조절기작을 밝혀내는 것이 중요한 과제로 사료된다.

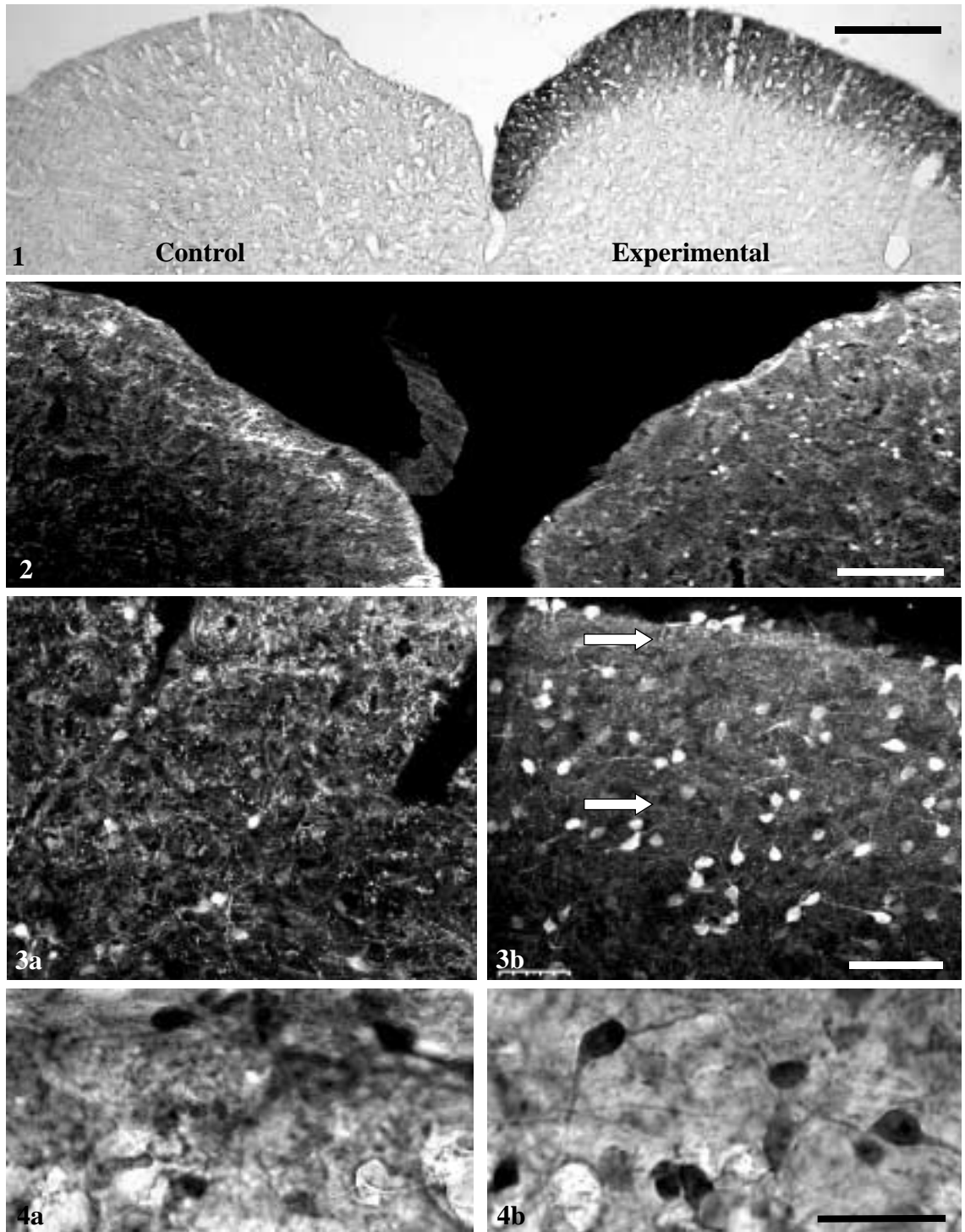
참 고 문 헌

- Andressen C, Blumcke I, Celio MR : Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271: 181-208, 1992.
- Arai M, Arai R, Sasamoto K, Kani k, Maeda T, Deura S, Jacobowitz DM : Appearance of calretinin-immunoreactive neurons in the upper layers of the rat superior colliculus after eye enucleation. *Brain Res* 613: 341-346, 1993.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH : Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15: 303-308, 1992.
- Braun K : Calcium-binding proteins in avian and mammalian central nervous system: localization, development and possible functions. *Prog Histochem Cytochem* 21: 1-64, 1990.
- Dean P, Pope SG, Redgrave P : Influence of novelty on locomotor hyperactivity after lesions of superior colliculus in rats. *Behav Brain Res.* 5: 213-218, 1982.
- Demeulemeester H, Arckens L, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW, Pochet R : Calcium binding proteins as molecular markers for cat geniculate neurons. *Exp Brain Res* 83: 513-520, 1991.
- D'Orlando C, Fellay B, Schwaller B, Salicio V, Bloc A, Gotzos V, Celio MR : Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res* 909: 145-158, 2001.
- Drager UC, Hubel DH : Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *J Neurophysiol* 39: 91-101, 1976.
- Finlay BL, Sengelaub DR, Berian CA : Control of cell number in the developing visual system. I. Effects of monocular enucleation. *Brain Res* 393: 1-10, 1986.
- Giordano DL, Murray M, Cunningham TJ : Naturally occurring neuron death in the optic layers of superior colliculus of the postnatal rat. *J Neurocytol* 9: 603-614, 1980.
- Gobersztejn F, Britto LRG: Calretinin in the mouse superior colliculus originates from retinal ganglion cells. *Braz J Med Biol Res* 29: 1507-1511, 1996.
- Harting JK, Hall WC, Diamond IT, Martin GF : Anterograde degeneration study of the superior colliculus in *Tupaia glis*: evidence for a subdivision between superficial and deep layers. *J Comp Neurol* 148: 361-386, 1973.
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DE, Heizmann CW, Streit P : Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 76: 467-472, 1989.
- Heizmann CW, Braun K : Calcium Regulation by Calcium-Binding Proteins in Neurodegenerative Disorders, New York, Springer-Verlag, pp 57-76, 1995.
- Hiroshima K, Maeda T, Hanada K, Wakisaka S : Calretinin-like immunoreactivity in the regenerating periodontal ruffini endings of the rat incisor following injury to the inferior alveolar nerve. *Brain Res* 807: 218-221, 1997.
- Huerta MF, Harting JK : Sublamination within the superficial gray layer of the squirrel monkey: an analysis of the tectopulvinar projection using anterograde and retrograde transport methods. *Brain Res* 261: 119-126, 1983.
- Jeon MH, Jeon CH : Immunocytochemical localization of calretinin containing neurons in retina from rabbit, cat, and dog. *Neurosci Res.* 32: 75-84, 1998.
- Kanaseki T, Sprague JM : Anatomical organization of pretectal nuclei and tectal laminae in the cat. *J Comp Neurol* 158: 319-337, 1974.
- Kang YS, Park WM, Lim JK, Kim SY, Jeon CJ : Changes of calretinin, calbindin D28K and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of the hamster superior colliculus following monocular enucleation. *Neurosci Lett* 330: 104-108, 2002.

- Kawai K, Nowak TS Jr, Klatzo I : Loss of parvalbumin immunoreactivity defines selectively vulnerable thalamic reticular nucleus neurons following cardiac arrest in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 89: 262–269, 1995.
- Kosinski CM, Cha JH, Young AB, Persichetti F, MacDonald M, Gusella JF, Penney JB Jr, Standaert DG : Huntingtin immunoreactivity in the rat neostriatum : differential accumulation in projection and interneurons. *Exp Neurol* 144: 239–247, 1997.
- Lane RD, Allan DM, Bennett–Clarke CA, Rhoades RW : Differential age–dependent effects of retinal deafferentation upon calbindin– and parvalbumin–immunoreactive neurons in the superficial layers of the rat’s superior colliculus. *Brain Res* 740: 208–214, 1996.
- Langer TP, Lund RD : The upper layers of the superior colliculus of the rat: a Golgi study. *J Comp Neurol* 158: 418–435, 1974.
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S : Evidence for calcium–reducing and excit–protective roles for the calcium–binding protein calbindin–D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 6: 41–51, 1991.
- McHaffie JG, Stein BE : Eye movements evoked by electrical stimulation in the superior colliculus of rats and hamsters. *Brain Res* 247: 243–253, 1982.
- Mize RR, Jeon CJ, Butler GD, Luo Q, Emson PC : The calcium binding protein calbindin–D28K reveals subpopulations of projection and interneurons in the cat superior colliculus. *J Comp Neurol* 307: 417–436, 1991.
- Mize RR, Luo Q, Butler G, Jeon CJ, Nabors B : The calcium binding proteins parvalbumin and calbindin–D 28K form complementary patterns in the cat superior colliculus. *J Comp Neurol* 320: 243–256, 1992a.
- Mize RR, Luo Q, Tigges M : Monocular enucleation reduces immunoreactivity to the calcium–binding protein calbindin 28kD in the rhesus monkey lateral geniculate nucleus. *Vis Neurosci* 9: 471–482, 1992b.
- Nabors LB, Mize RR : A unique neuronal organization in the cat pretectum revealed by antibodies to the calcium–binding protein calbindin–D28K. *J Neurosci* 11: 2460–2476, 1991.
- Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R : Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci* 5: 1–16, 1990.
- Polans A, Baehr W, Palczewski : Turned on by Ca^{2+} ! The physiology and pathology of Ca^{2+} –binding proteins in the retina. *Trends Neurosci* 19: 547–554, 1996.
- Rogers J : Calretinin : a gene for a novel calcium–binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* 105: 1343–1353, 1987.
- Tokunaga A, Otani K : Dendritic patterns of neurons in the rat superior colliculus. *Exp Neurol* 52: 189–205, 1976.
- Winsky L, Jacobowitz DM : Effects of unilateral cochlea ablation on the distribution of calretinin mRNA and immunoreactivity in the guinea pig ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 354: 564–582, 1995.
- Zheng JL, Gao WQ : Analysis of rat vestibular hair cell development and regeneration using calretinin as an early marker. *Neuroscience* 17: 8270–8282, 1997.

Legends for Figures

- Fig 1.** Tracing of visual pathway in neonatal rat using cholera toxin immunohistochemistry. Two days after ocular injection of cholera toxin, the contralateral superior colliculus (SC) exhibits the intense labelling with cholera toxin antibody. Scale bar = 800 μ m
- Fig 2.** Effect of neonatal monocular enucleation upon the calretinin (CR)–immunoreactive (IR) cells in the superficial layer of SC. 4 weeks after eye enucleation, dense CR–IR fibers are observed in the control side compared to experimental side. Scale bar = 200 μ m
- Fig 3.** In contrast to finding of CR–IR fibers, the numerous CR–IR cells are newly appeared on the experimental side (3b) compared to control (3a) in the confocal microscopic views. Upper arrow : stratum zonule, lower arrow : stratum griseum superficiale. Scale bar = 100 μ m
- Fig 4.** The vertically and horizontally oriented CR–IR cells are observed in the experimental side (4b) of superior colliculus. 4a : control side. Scale bar = 50 μ m



Abstract

Changes of Calretinin–Immunoreactivities in the Rat Superior Colliculus after Eye Enucleation

Sang–Pil Yoon, Han–Yong Kim¹, Young–Jin Jun², In–Youb Chang^{3,4}

Department of Anatomy, ¹Plastic Surgery, College of Medicine, Seonam University

²Department of Pharmacology, ³Anatomy, College of Medicine, Chosun University

⁴Research Center for Proteinous Materials, Chosun University

Calcium–binding proteins play an important role in the protection, differentiation, and reorganization of the central nervous system.

The effects of neonatal retinal deafferentation on calretinin, and tracing of retinotectal pathway were examined immunohistochemically in the superficial layer of the rat superior colliculus.

Tracing with cholera toxin was revealed on the superior colliculus contralateral to the ocular injection. On the contralateral side of superior colliculus, the calretinin–immunoreactive (IR) cells were dramatically increased, calretinin–IR fibers were markedly decreased in the superficial layer.

These results show that retinal deafferentation results in an increase of calretinin–immunoreactive cells within the superficial layers of the superior colliculus, which suggest reorganization of neurons in superior colliculus.

Key words : Calretinin, Superior colliculus, Monocular enucleation, Rat