발생 중 마우스 망막에서 방향특이성 신경절세포의 NMDA R1 수용체의 시냅스 패턴

이지건¹, 권오주², 전창진^{1,*}

¹경북대학교 생명과학부 생물학과, 대구 702-701

²부산과학기술대학교 보건웰빙학부 안경광학과, 부산 616-737

투고일(2013년 10월 30일), 수정일(2013년 11월 21일), 게재확정일(2013년 12월 14일)

목적: 본 연구에서는 발생 중[태어난 지 5일(P5), 10일(P10)] 마우스 망막의 ON-OFF 방향특이성 신경절세포 수상돌기 상에서 NMDA R1 수용체의 시냅스 패턴을 연구하고자 하였다. **방법:** ON-OFF 방향특이성 신경절세포는 Lucifer yellow를 주사하여 형태학적 특징으로 동정하였다. 이극세포로부터의 글루타메이트의 흥분성 유입을 확인하기 위해 membrane traffic motor 단백질 마커인 kinesin을 이용하였다. **결과:** 본 연구에서 P5, P10의 ON-OFF 방향특이성 신경절세포를 동정할 수 있었으며, NMDA R1의 면역반응반점은 내망상층에서 강하게 나타났다. ON-OFF 방향특이성 신경절세포의 수상돌기상의 수용체의 분포패턴에서 방향특이성을 예측할 수 있는 어떠한 비대칭성도 발견하지 못하였다. **결론:** 이극세포로부터의 글루타메이트성 자극유입은 P5, P10 단계에서 모두 균형적으로 유입되며, 방향특이성은 NMDA R1 수용체의 특이적인 패턴에 있지 않음을 밝혔다.

주제어: 방향특이성, NMDA 수용체, 시냅스 패턴, 신경절세포, 단일세포주사기법, 면역조직화학법

서 론

시각정보의 출발점인 망막은 중추신경계의 일부이지만 물리적으로 접근하기 쉬운 뿐 아니라 신경 화학적으로도 중추신경계에 존재하는 다양한 신경전달물질(neurotransmitter)들이 존재하며, 여러 가지 신경세포들이 존재하는 것으로 밝혀져 신경기작을 이해하기 위해 가장 많이 연구되어온 연구재료라고 할 수 있다.^[1,2]

망막에서 일어나는 여러 가지 신경기작 중에 특히, 정방향(preferred direction)으로 움직이는 물체에 대해서는 강하게 반응하지만, 반대방향(null direction)으로 움직이는 물체에 대해서는 거의 반응하지 않는 특성을 방향특이성(direction selectivity)이라 부른다. 이러한 특성 때문에 우리는 움직이는 모든 사물에 대한 적절한 신체반응을 할 수 있다.^[3]

방향특이성은 약 50년 전에 토끼 망막에서 처음 발견되었다. 그 이후로 방향특이성의 신경기작을 이해하기 위한 많은 연구들이 수행되고 있지만 현재까지 방향특이성을 일으키는 원인에 대한 명확한 대답은 미지로 남아있다.^[4]

Barlow와 Levick은 방향특이성이 두개의 입력신호(input) 즉, 첫째로 이극세포(bipolar cell)로부터 오는 것과

두 번째로 공간적으로 측면(laterally displaced)에서 시간적으로 지연되어 입력되는 억제성 입력신호들에 의해서 이론적으로 설명할 수 있다고 가설을 세웠다.^[5] 이러한 가설을 기본으로 현재까지 방향특이성에 대한 다양한 연구가 활발히 진행 중에 있다.^[6-13]

방향특이성 신경절세포(direction-selective retinal ganglion cell, DS-RGC)의 형태적 구조는 세포내 염료 주입과 생리적 막전위 기록을 통해 알려지게 되었다. 현재까지 마우스 망막에서 3가지 형태의 방향특이성 신경절세포가 발견되었다.^[14-16] 그 중에서 ON-OFF 방향특이성 신경절세포는 가장 잘 특징화된 세포형태이다. 이 세포는 내망상층(inner plexiform layer, IPL)의 70% 깊이의 층인 ON과 20% 깊이의 층인 OFF의 2개의 수상돌기 층(dendritic arbors)을 가지고 뻗어있다.^[14,17,18] 이러한 방향특이성 신경절세포는 외형상 별집모양의 수상돌기를 가지며, 이 수상돌기는 세포체를 향해서 휘어져있다.^[19,20]

방향특이성을 일으키기 위해서는 방향특이성 신경절세포에 흥분성 자극과 억제성 자극 모두가 필요하다.^[5,20,21] 현재까지 알려진 바에 의하면 방향특이성에 기여하는 흥분성 역할을 하는 신경전달물질에는 아세틸콜린(acetylcholine)과 글루타메이트(glutamate) 등이 있다. 각각의 세포는 이러

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

한 신경전달물질을 이용하여 고유의 정보들을 다양한 표적(target)으로 전달한다.^[22]

본 연구에서는 이극세포가 글루타메이트를 통해 방향특이성 신경절세포에 흥분성 자극을 전달할 때, 어떠한 패턴을 가지고 전달하는지를 연구하고자 하였다. 또한, 방향특이성의 연구에 있어서 유전학적으로 연구가 용이한 마우스를 이용하여 태어난 지 5일(postnatal, P5), 그리고 10일(postnatal, P10) 마우스 망막을 대상으로 연구를 수행하였다. 이는 마우스 망막의 발달상 태어난 지 8일째 되는 시점에 글루타메이트 매개의 망막활성(retinal activity)이 활발하다고 보고되어지며 또한 태어난 지 12일째에 마우스가 눈을 뜬다는 점에 착안하여 시기를 선택하였다.^[23,24]

따라서 본 연구에서는 아직까지 많은 논란이 제기되고 있는 방향특이성의 신경기작을 이해하기 위하여, 이극세포로부터 글루타메이트성(glutamatergic) 자극을 받는 ON-OFF 방향특이성 신경절세포 수상돌기(dendrite) 상의 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) R1 수용체의 시냅스 패턴이 어떠한지를, 망막의 발달상 중요한 시기인 태어난 지 5일(P5), 10일(P10) 마우스 망막을 대상으로 실험을 수행함으로써 각 발생 단계별로 어떠한 시냅스 분포 패턴의 차이가 있는지를 비교 분석하였다. 최종적으로 이러한 결과를 통해 방향특이성 신경절세포의 메커니즘을 더 깊이 이해하고 나아가 포유동물의 시각중추계의 기능을 이해하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 망막의 분리(retina isolation)

실험모델로 사용된 C57BL/6 마우스(P5, 그리고 P10)는 ketamine hydrochloride (30~40 mg/kg)와 xylazine (3~6 mg/kg) 혼합물을 이용하여 마취하였다. 눈감박반사를 방지하기 위해 눈의 각막에 국부 마취제인 proparacaine HCl (100~200 l)을 사용하였다. 또한 막을 보호하기 위해 소량의 calcium chloride도 첨가하였다. 안구는 적도(equator)부분에서 절반으로 자르고, 수정체와 유리체를 제거하였다. 망막을 적출 할 때에는 ames' medium (Sigma-Aldrich, USA) 상에서 시행하였는데, 분리된 망막 또한 산소 95%와 이산화탄소 5%로 유지되는 ames' medium에 담구어 두었다.^[25,26] 동물에 관련된 모든 실험과정은 Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research의 ARVO Statement 가이드라인에 따랐다.

2. 단일세포주사기법(single cell injection)

분리된 망막은 망막의 세포를 표지하기 위해 핵 염색 물질인 DAPI를 이용하여 염색하였다. 단일세포주사기법을

위해 망막을 millipore filter paper (0.45 mm, Black, HABP 47 mm)에 조심스럽게 신경절세포를 위쪽 방향으로 mounting 한 후 특수하게 제작한 superfusion chamber로 옮겨 실험을 수행하였다. 준비된 조직은 zeiss fixed stage fluorescence microscope에 특수 제작한 stage에 mounting 한 후 망막을 살아있는 상태로 지속시키기 위해서 ames' medium으로 관류시켜 주었다. Lucifer yellow를 미세전극에 채운 후 전류 발생기를 이용하여 주사하였으며, 이 방법은 이 기술을 처음으로 개발한 Dr. Masland의 방법을 따랐다.^[27] 방향특이성 신경절세포는 그 특징적인 세포의 모양에 의해 세포가 Lucifer yellow로 채워지게 되면 다른 신경절세포와 구분이 가능하게 된다.

3. 형광 면역조직화학법(fluorescence immunocytochemistry)

Lucifer yellow가 주입된 망막은 고정액(4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4)에서 2시간 동안 고정하였다. 형광 면역조직화학법의 세부적인 과정은 이전 실험논문에서 자세히 소개 되어있다.^[28] ON-OFF 방향특이성 신경절세포상의 NMDA R1 수용체를 확인하기 위해 1차 항체로 anti NMDA R1 (1:100-200, Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하였으며, 2차 항체로 cy5 anti rabbit goat IgG (1:100-200, Jackson ImmunoResearch, USA)를 이용하였다.

또한, 이극세포로부터의 ribbon synapses를 확인하기 위하여 mouse anti kinesin II (1:100-200, Covance, USA)와 cy3-conjugated anti mouse IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch, USA)를 각각 이용하였다. 형광 면역조직화학법이 끝난 조직은 vectashield mounting medium (Vector Laboratories, USA)을 이용하여 슬라이드를 제작하였다. 음성대조군으로 약간의 조직을 1차 항체 없이 처리하였으며 대조군 조직에서는 어떠한 면역반응도 관찰되지 않았다.

4. 망막 수직절편 준비(vertical section of retina)

망막의 수직절편 상에서 NMDA R1의 분포를 살펴보기 위해 일부 망막들은 Millipore filter paper에 조심스럽게 신경절세포층(ganglion cell layer)을 위 쪽 방향으로 mounting 한 후 2~3시간 정도 고정을 하였다. 이후 4% agarose gel을 이용하여 포매(embedding) 한 후, vibratome (Vibratome 3000, The Vibratome Company, USA)을 이용해서 50 μ m 두께로 관상단면으로 절단한 뒤 형광 면역조직화학법을 실시하였다.

5. 데이터분석

방향특이성 신경절세포는 공초점현미경(LSM 700, Carl

Zeiss Meditec Inc., Jena, Germany)을 이용하여 분석하였다. 삼중표지(triple-labeling)된 세포를 관찰하기 위해 Lucifer yellow (488 nm), kinesin II (568 nm), 그리고 NMDA R1 (647 nm)의 emission filter를 이용하였다. ON-OFF 방향특이성 신경절세포의 전체 수상돌기를 정확히 관찰하기 위해서 Z-stack으로 이미지를 획득하였다. 유효한 면역반응반점(immune reactive punctum)에 대한 자세한 분석법은 앞서 보고된 연구에서 상세히 기술하였다.^[29]

본 연구에서는 8개의 주요 방향에 있는 ON-OFF 수상돌기 위의 NMDA R1 수용체 면역반응반점을 계산하였다 (Fig. 6A). 첫째, NMDA R1 수용체의 밀도는 linear dendritic extent (면역반응반점 수/ μm dendrite)로 표현되었다. 그래프에서 볼 수 있듯이, 면역반응반점 수/ μm dendrite로 나타내어지는 수용체의 평균밀도를 세포중앙으로부터 바깥 쪽 방향으로 10 μm 간격으로 계산하였다. 둘째, NMDA R1 수용체 밀도는 8개 주요 방향의 수상돌기 상의 면역반응반점 수/ μm dendrite 전체길이의 평균밀도로 표현되었다.

ON-OFF 수상돌기 상에 위치한 수용체의 정확한 공간적 대칭성을 측정하는 SI (symmetry index) 값은 앞의 분포밀도로부터 계산하였다. SI값은 다음의 식을 사용하여 각각의 세포에서 계산하였다 [$SI=10(B/A)$].^[30] A는 방향특이성 신경절세포의 8개 방향 중 하나에 있는 NMDA R1 수용체 면역반응 반점의 공간적 밀도이고, B는 A와 대칭적 위치의 수상돌기에 있는 면역반응 반점의 공간적 밀도이다. SI의 범위를 최소 0에서 최대 10으로 하기 위해 비율에 10을 곱하였다. 즉, SI 값이 10이면 완전히 대칭적임을 의미하고 반대로 0이면 대칭성이 없다는 것을 의미한다.

결 과

1. ON-OFF 방향특이성 신경절세포의 형태적 특징

Fig. 1은 본 연구에서 분석한 방향특이성 신경절세포의 전체적인 형태를 보여준다. 수상돌기는 내망상층의 70% 깊이의 ON층과, 20% 깊이의 OFF층의 두층에 걸쳐 뻗어 있는 형태를 지니고 있다. 또한, 방향특이성 신경절세포의 수상돌기는 벌집형태(honeycomb)로 겹쳐져 있다. 마우스의 망막에서 이러한 특징을 가진 다른 뉴런은 보고된 바가 없으므로, 세포를 식별하는 명백한 특징이 될 수 있다.^[19] Fig. 1A는 P5 마우스 망막에서 동정한 방향특이성 신경절 세포이며, Fig. 1B는 P10 마우스 망막에서 동정한 방향특이성 신경절세포이다. 본 연구에서는 이 두 개의 세포를 대상으로 NMDA R1의 시냅스 분포 패턴을 분석하였다.

2. 망막의 수직절편 상에서의 NMDA R1 분포

마우스 망막의 수직절편에서 NMDA R1의 분포를 확인

Fig. 1. ON-OFF direction-selective ganglion cells injected with Lucifer yellow. In these micrographs, taken at low magnification, both dendritic arbors are visible. The cells in panels (A), and (B) were used to analyze the distribution of NMDA glutamate receptor subtype NMDA R1 immunoreactivity, respectively. Bar = 20 μm .

Fig. 2. Fluorescence confocal micrographs of vertical vibratome sections through midperipheral mouse retina immunolabeled with antibodies against NMDA glutamate receptor subtype NMDA R1 in P5 (A), and NMDA R1 in P10 (B). OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bar = 20 μm .

하기 위해서 각각의 마우스 망막을 수직 방향으로 절단하여 특이적인 항체로 반응시켰다. Fig. 2A와 Fig. 2B는 각각 P5와 P10 마우스 망막의 NMDA R1의 면역반응반점을 나타낸 그림이다. 면역반응반점은 두 발생 단계 모두에서 내망상층에서 강하게 나타났다. 또한, 외망상층(outer plexiform layer, OPL)에서도 약한 면역반응반점을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 면역조직화학법을 이용하여 마우스 망막을 분석한 다른 연구와 동일한 결과를 보였다.^[31] 또한, 발생 중 마우스 망막에서의 NMDA 수용체의 mRNA 분석결과와도 유사한 결과를 보였다.^[32]

3. ON-OFF 층에서의 NMDA R1 분포

ON-OFF 방향특이성 신경절세포는 내망상층의 ON과 OFF 층에 각각 수상돌기를 분지하고 있다. Fig. 3은 방향

Fig. 3. Fluorescence confocal micrographs of midperipheral mouse retinal whole mounts immunolabeled with antibodies against NMDA R1 in P5 (A, C), and NMDA R1 in P10 (B, D). Panels (A), and (B) were taken from ON layers, while panels (C), and (D) were taken from OFF layers. Strong punctate immunoreactivity is present in both the ON and OFF layers. Bar = 10 μ m.

특이성 신경절세포의 ON과 OFF 층에서 NMDA R1의 분포를 확인하기 위해, 각 발생 단계에 따라 두 층에서의 면역반응반점을 보여주고 있다. 그림에서 볼 수 있듯이, 모든 발생 단계의 마우스 망막에서 면역반응반점들은 내망상층의 ON과 OFF sublamina 모두에서 현저하게 나타남을 확인할 수 있었다.

4. 수상돌기, NMDA R1 그리고 kinesin II 의 삼중표지

본 연구에서는 이극세포로부터의 글루타메이트성 자극 유입과 그 자극을 받는 방향특이성 신경절세포의 NMDA R1을 직접 보여주기 위해, 수상돌기, NMDA R1, 그리고 kinesin II에 대해 망막을 삼중표지 하였다(Fig. 4). 일반적으로 kinesin II는 외망상층과 내망상층 모두에서 synaptic ribbon들의 마커로 나타난다.^[33] Fig. 4에서 확인할 수 있듯이, kinesin II (blue)와 NMDA R1 (red)이 겹쳐져 있으며, 이것은 또한 수상돌기(green) 위에서 co-localization 됨을 확인할 수 있다. NMDA R1과 kinesin II에 대해 이중표지(double labeling) 했을 때, NMDA R1에 대한 면역반응반점들은 kinesin II-labeled ribbon들과 일치하였다. Fig. 4에서 P5, 그리고 P10 각각에 대한 kinesin II (blue)는 패널 A, F에 나타나 있고, NMDA R1 (red)은 패널 B, G에 나타나 있다. 패널 C, H에서 두 개의 이미지가 병합되어 나타나 있다. 또한, D, I에서 볼 수 있듯이 겹쳐진 면역반응반점은 수상돌기와의 co-localization되어 있음을 확인할 수 있으며, 이 이미지에서 화살표로 나타내 보이고 있다. E, J에서는 각 수상돌기 이미지만을 따로 나타내었으며, 우리가 분석한 특정 시냅스는 점(purple)으로 표지하였다. 본 연구에서는 이와 같은 방법으로 각 발생 단계별 방향특이성 신경절세포의 ON과 OFF 층에 대하여 분석을 수행하였다.

5. 전체 세포 상에서의 NMDA R1 분포

Fig. 5는 각 발생 단계별 방향특이성 신경절세포의 NMDA R1의 분포를 도식화 한 것이다. 수상돌기(black)에 붉은 점은 ON층을 나타내며, 수상돌기(green)에 푸른 점은 OFF층을 나타낸다. 또한, 두 층의 수상돌기를 병합시

Fig. 4. Fluorescence confocal micrographs of retinal whole mounts immunolabeled with antibodies against kinesin II (A, F), and NMDA R1 (B, G) in developing stages. (C) Superimposed image of kinesin II and NMDA R1 in P5. (H) Superimposed image of kinesin II and NMDA R1 in P10. NMDA GluR immunoreactive puncta coincide with kinesin-labeled ribbons. The arrowheads indicate double labeled puncta of kinesin II and NMDA R1 overlapping upon the dendrites. (D, I) Merged images of dendrite, kinesin II immunoreactivity, and NMDA GluR immunoreactivity. (E, J) Tracing of dendrite and co-localized kinesin II and NMDA puncta. Bar = 5 μ m.

Fig. 5. Reconstructed figures from digital photomicrographs showing the distribution of P5 NMDA R1 (A, B), and P10 NMDA R1 (D, E) on the ON (left column, black line with red dots) and OFF (middle column, green line with blue dots) dendritic arbors of direction-selective retinal ganglion cells. Merged images of ON and OFF (right column) dendritic arbors of direction-selective cells and NMDA receptor immunoreactivity.

Fig. 6. Densities of P5 NMDA R1 (B), and P10 NMDA R1 (C) subunit immunopuncta on the ON and OFF dendritic arbors of direction-selective retinal ganglion cells. (A) Method for calculating separately the distribution of NMDA subunit immunopuncta for each of the eight cardinal directions along the possible preferred-null axes. The central graphs (B), and (C) show the average density of immunoreactive puncta/total length of dendrites (μm) within each cardinal direction.

킨 이미지를 확인할 수 있다. 그림에서 볼 수 있듯이, NMDA R1은 외관상 매우 고르게 전체 수상돌기에 분포하고 있다. Fig. 5A-C는 각각 P5, 그리고 그림 Fig. 5D-F는 각각 P10 마우스의 방향특이성 신경절세포를 대상으로 분포를 재구성하였다.

6. NMDA R1의 분포 밀도

이로부터 각 발생 단계별 방향특이성 신경절세포상의 NMDA R1의 분포를 가능한 정(preferred)-반대(null)방향

Fig. 7. The histogram of the symmetry index (SI) for a spatial density of NMDA immunopuncta on the ON and OFF dendritic arbors of direction-selective retinal ganglion cells. A SI value of 10 indicates a complete symmetry, and a SI value of 0 indicates no symmetry.

을 따라 뻗은 8개의 주요 방향에 대해(Fig. 6A) 수상돌기 위 NMDA R1의 면적반응반점의 수를 계산했다. 막대그래프는 면적반응반점수/중심으로부터의 μm 의 평균밀도를 보여준다(각 주요 방향에 대해 세포체의 중앙으로부터 수상돌기 끝 쪽으로 10 μm 간격). NMDA R1 면적반응반점의 밀도는 각 주요 방향에 속한 면적반응반점 수/ μm dendrite 전체길이의 평균밀도로 나타내었다.

7. Symmetry Index (SI)

우리는 최종적으로 위의 계산을 통해서 Fig. 7에서 보이는 SI 표를 추출해 내었는데, 보이는 것과 같이 NMDA R1의 분포는 분석한 모든 층에서 10에 가까운 값을 보이며, 균일하게 분포하고 있음을 관찰 할 수 있었다. 즉, 각 발생 단계별로 방향특이성 신경절세포 상에 위치하는 NMDA R1 시냅스 분포 패턴은 매우 대칭적임을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 방향특이성의 기작을 이해하기 위하여, 이극세포로부터 글루타메이트성 자극을 받는 ON-OFF 방향특이성 신경절세포 상의 NMDA R1 수용체의 시냅스 패턴을 분석하고자 발생 중인 마우스 망막을 대상으로 실험을 수행하였다. 그 결과, P5, 그리고 P10 마우스 망막 모두에서 어떠한 비대칭적인 시냅스 패턴도 발견하지 못하였다. 사실, 정확한 시냅스의 분석을 위해서는 전자현미경(electron microscopy)의 사용이 필수적이다. 하지만 본 연구에서는 세포 수상돌기 전체에 분포한 수용체의 패턴을 분석하는 것이 목표이므로 고해상도의 공초점현미경(confocal microscopy)을 사용하였다.

지금까지 방향특이성에 대한 연구는 주로 성체 동물을

대상으로 수행되었으며, 연구방법 또한 주로 전기생리학 적, 약리학적인 방법으로 수행되어왔다. 본 연구에서는 발생 중인 마우스 망막에서 방향특이성 신경절세포의 시냅스 패턴을 분석하였다. 마우스와 토끼의 경우, 방향특이성이 처음으로 발견되는 시기는 눈을 뜨고 난 후부터이다.^[11,34-38] 그러나 마우스 망막의 경우 눈을 뜨기 전부터 이미 거의 완전한 층화(lamination)를 이루고 있다. 본 연구에서는 세포의 형태학적인 특징을 근거로 P5 ON-OFF 방향특이성 신경절세포를 동정할 수 있었다. 이는, 태어난 지 3일부터 성체 세포와 유사한 외형을 가지고 있다는 이전 연구 결과와 일치하였다.^[39]

일반적으로 원추세포(cone cell)의 자극을 받는 이극세포는 신경전달물질로 글루타메이트를 방출한다.^[40-42] 이온성 글루타메이트(ionotropic glutamate) 수용체에는 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), 그리고 kainate (KA)가 있다.^[43-45] 이전의 여러 연구에서, 이러한 글루타메이트 수용체의 작용을 막았을 경우 방향특이성이 사라짐을 확인하였다.^[46,47] 특히, Cohen and Miller는 방향특이성 신경절 세포로의 글루타메이트 유입의 대부분이 NMDA 수용체를 매개로 한다고 보고하였다.^[48] 이를 종합하면, 글루타메이트를 받는 수용체가 방향특이성을 결정하는데 아주 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 본 연구진은 이전 연구에서 마우스 망막을 대상으로 글루타메이트 수용체 중 kainate 수용체의 시냅스 패턴을 분석한 결과 어떠한 비대칭적인 패턴도 발견하지 못하였다.^[49] 본 연구에서도, 이전의 결과와 유사하게 NMDA R1의 시냅스 패턴은 세 발생 단계에서 거의 대칭적이었다. 그러나 앞으로 많은 다른 종류의 수용체 아형에 대한 시냅스 분포 패턴에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

NMDA 수용체는 발생 중 시상(thalamus)과 시각피질(visual cortex)의 가소성(plasticity)에 있어서도 중요한 역할을 담당한다.^[50-53] 그러나 현재까지 발생 중 망막에서 일어나는 변화와 NMDA 수용체와의 관계성에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다. 최근 연구결과에 의하면, NMDA R1의 발현은 시각적 경험(visual experience)과는 독립적이며, 또한 빛의 박탈(deprivation)과도 아무 상관이 없다고 보고되었다.^[54] 본 연구에서도 이와 동일하게 수상돌기의 형태나 시냅스 유입은 시각적 경험이나 빛의 박탈과는 무관하고, 모든 발생 단계에서 균형적으로 분포하고 있음을 알 수 있었다. 그럼에도 불구하고, 특정 방향에 대한 선호를 가진 방향특이성 신경절세포들의 분포는 눈을 뜬 이후에 더욱 정교화(refinement) 된다고 한다.^[23] 이러한 점에서, 발생 중 망막에서 일어나는 방향특이성에 대해 앞으로 꾸준한 연구가 필요할 것으로 보인다.

한편, 방향특이성에 있어서 아주 중요한 역할을 한다고 알려진 성상형 무축삭세포(starburst amacrine cell)는 아세틸콜린(acetylcholine)과 γ -aminobutyric acid(GABA)를 동시에 분비한다고 알려져 있다.^[55] 최근의 연구결과에서 성상형 무축삭세포로부터의 비대칭적인 억제성 신호가 방향특이성을 일으키는데 필수적인 요소라 보고되었다.^[7,11,12]

이러한 점을 종합해 볼 때, 방향특이성을 이해하기 위해서 글루타메이트 수용체의 다른 아형에 대한 분석과 함께 망막의 발생 과정 중 일어나는 성상형 무축삭세포와 방향특이성 신경절세포간의 상호작용에 대한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

결론적으로, 본 연구에서는 방향특이성을 이해하기 위해 망막의 발생 단계를 따라 ON-OFF 방향특이성 신경절 세포 상에 있는 NMDA R1의 시냅스 패턴을 분석하였다. 그 결과, 두 발생 단계 모두에서 어떠한 특징적인 수용체의 패턴이 발견되지 않았다. 즉, 글루타메이트성 자극의 유입은 이른 발생 단계시절부터 균형적으로 유입이 되며, 방향특이성은 NMDA 수용체의 특이적인 패턴에 있지 않았다. 이러한 결과는 방향특이성의 신경기작을 이해하는데 도움이 되리라 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2010-0003717).

REFERENCES

- [1] Masland RH. Neuronal cell types. *Curr Biol.* 2004; 14(13):497-500.
- [2] Taylor WR, Vaney DI. Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina. *J Neurosci.* 2002;22(17):7712-7720.
- [3] Vaney DI, Sivyer B, Taylor WR. Direction selectivity in the retina: symmetry and asymmetry in structure and function. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(3):194-208.
- [4] Barlow HB, Hill RM. Selective sensitivity to direction of movement in ganglion cells of the rabbit retina. *Science.* 1963;139(3553):412-414.
- [5] Barlow HB, Levick WR. The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J Physiol.* 1965;178(3):477-504.
- [6] Borg-Graham LJ. The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell.

- Nat Neurosci. 2001;4(2):176-183.
- [7] Briggman KL, Helmstaedter M, Denk W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature*. 2011;471(7337):183-188.
 - [8] Koizumi A, Jakobs TC, Masland RH. Regular mosaic of synaptic contacts among three retinal neurons. *J Comp Neurol*. 2011;519(2):341-357.
 - [9] Masland RH. The many roles of starburst amacrine cells. *Trends Neurosci*. 2005;28(8):395-396.
 - [10] Taylor WR, He S, Levick WR, Vaney DI. Dendritic computation of direction selectivity by retinal ganglion cells. *Science*. 2000;289(5488):2347-2350.
 - [11] Wei W, Hamby AM, Zhou K, Feller MB. Development of asymmetric inhibition underlying direction selectivity in the retina. *Nature*. 2011;469(7330):402-406.
 - [12] Yonehara K, Balint K, Noda M, Nagel G, Bamberg E, Roska B. Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit. *Nature*. 2011;469(7330):407-410.
 - [13] Yoshida K, Watanabe D, Ishikane H, Tachibana M, Pastan I, Nakanishi S. A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron*. 2001;30(3):771-780.
 - [14] Weng S, Sun W, He S. Identification of ON-OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *J Physiol*. 2005;562(3):915-923.
 - [15] Sun W, Deng Q, Levick WR, He S. ON direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *J Physiol*. 2006;576(1):197-202.
 - [16] Kim JJ, Zhang Y, Yamagata M, Meister M, Sanes JR. Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature*. 2008;452(7186):478-482.
 - [17] Ariel M, Daw NW. Pharmacological analysis of directionally sensitive rabbit retinal ganglion cells. *J Physiol*. 1982;324(1):161-185.
 - [18] Amthor FR, Oyster CW, Takahashi ES. Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Res*. 1984;298(1):187-190.
 - [19] Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*. 2002;451(2):115-126.
 - [20] Vaney DI. Territorial organization of direction-selective ganglion cells in rabbit retina. *J Neurosci*. 1994;14(11):6301-6316.
 - [21] Vaney DI, Taylor WR. Direction selectivity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(4):405-410.
 - [22] Yonehara K, Farrow K, Ghanem A, Hillier D, Balint K, Teixeira M et al. The first stage of cardinal direction selectivity is localized to the dendrites of retinal ganglion cells. *Neuron*. 2013;79(6):1078-1085.
 - [23] Chan YC, Chiao CC. The distribution of the preferred directions of the ON-OFF direction selective ganglion cells in the rabbit retina requires refinement after eye opening. *Physiol Rep*. 2013;1(2):e00013.
 - [24] McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron*. 2003;40(6):1147-1160.
 - [25] Ames A, Nesbett FB. In vitro retina as an experimental model of the central nervous system. *J Neurochem*. 1981;37(4):867-877.
 - [26] Yang G, Masland RH. Receptive fields and dendritic structure of directionally selective retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 1994;14(9):5267-5280.
 - [27] Yang G, Masland RH. Direct visualization of the dendritic and receptive fields of directionally selective retinal ganglion cells. *Science*. 1992;258(5090):1949-1952.
 - [28] Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*. 1998;18(21):8936-8946.
 - [29] Jeon CJ, Kong JH, Strettoi E, Rockhill R, Stasheff SF, Masland RH. Pattern of synaptic excitation and inhibition upon direction-selective retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*. 2002;449(2):195-205.
 - [30] Panno JP. Symmetry analysis of cell nuclei. *Cytometry*. 1988;9(3):195-200.
 - [31] Haverkamp S, Wssle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2000;424(1):1-23.
 - [32] Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. Differential distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina. *Brain Res*. 1994;634(2):328-332.
 - [33] Muresan V, Lyass A, Schnapp BJ. The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J Neurosci*. 1999;19(3):1027-1037.
 - [34] Bowe-Anders C, Miller RF, Dacheux R. Developmental characteristics of receptive organization in the isolated retina-eyecup of the rabbit. *Brain Res*. 1975;87(1):61-65.
 - [35] Masland RH. Maturation of function in the developing rabbit retina. *J Comp Neurol*. 1977;175(3):275-286.
 - [36] Chan YC, Chiao CC. Effect of visual experience on the maturation of ON-OFF direction selective ganglion cells in the rabbit retina. *Vision Res*. 2008;48(23-24):2466-2475.
 - [37] Elstrott J, Anishchenko A, Greschner M, Sher A, Litke AM, Chichilnisky EJ, Feller MB. Direction selectivity in the retina is established independent of visual experience and cholinergic retinal waves. *Neuron*. 2008;58(4):499-506.
 - [38] Sun L, Han X, He S. Direction-selective circuitry in rat retina develops independently of GABAergic, cholinergic and action potential activity. *PLoS One*. 2011;6(5):e19477.
 - [39] Coombs JL, Van Der List D, Chalupa LM. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development. *J Comp Neurol*. 2007;503(6):803-814.
 - [40] Massey SC. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog Ret Res*. 1990;9:399-425.
 - [41] Massey SC, Maguire G. The role of glutamate in retinal circuitry. In *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmis-*

- sion, San Diego: Academic Press, 1995;201-221.
- [42] Massey SC, Miller RF. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol.* 1990;63(1):16-30.
- [43] Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17(1):31-108.
- [44] Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1998;54(5):581-618.
- [45] Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1989;29(1):365-402.
- [46] Kittila CA, Massey SC. Pharmacology of directionally selective ganglion cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol.* 1997;77(2):675-689.
- [47] Tjepkes DS, Amthor FR. The role of NMDA channels in rabbit retinal directional selectivity. *Vis Neurosci.* 2000;17(2):291-302.
- [48] Cohen ED, Miller RF. Quinoxalines block the mechanism of directional selectivity in ganglion cells of the rabbit retina. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(4):1127-1131.
- [49] Lee JG, Lee KP, Jeon CJ. Synaptic pattern of KA1 and KA2 upon the direction-selective ganglion cells in developing and adult mouse retina. *Acta Histochem Cytochem.* 2012;45(1):35-45.
- [50] Catalano SM, Chang CK, Shatz CJ. Activity-dependent regulation of NMDAR1 immunoreactivity in the developing visual cortex. *J Neurosci.* 1997;17(21):8376-8390.
- [51] Guenther E, Schmid S, Wheeler-Schilling T, Albach G, Grneder T, Fauser S, Kohler K. Developmental plasticity of NMDA receptor function in the retina and the influence of light. *FASEB J.* 2004;18(12):1433-1435.
- [52] Kirkwood A, Rioult MC, Bear MF. Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature.* 1996;381(6582):526-528.
- [53] Xue J, Cooper NG. The modification of NMDA receptors by visual experience in the rat retina is age dependent. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;91(1-2):196-203.
- [54] Chang YC, Chen CY, Chiao CC. Visual experience-independent functional expression of NMDA receptors in the developing rabbit retina. *IOVS.* 2010;51(5):2744-2754.
- [55] Lee S, Kim K, Zhou ZJ. Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron.* 2010;68(6):1159-1172.

Synaptic Pattern of NMDA R1 upon the Direction-Selective Retinal Ganglion Cells in Developing Mouse Retina

Jee-Geon Lee¹, Oh-Ju Kwon², and Chang-Jin Jeon^{1,*}

¹Dept. of Biology, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea

²Dept. of Optometry, Busan Institute of Science and Technology, Busan, 616-737, Korea

(Received October 30, 2013; Revised November 21, 2013; Accepted December 14, 2013)

Purpose: To investigate the synaptic pattern of NMDA glutamate receptor subtype NMDA R1 on the dendritic arbors of ON-OFF direction-selective retinal ganglion cells (DS-RGSs) in developing [(5,10) days postnatal (PN)] mouse retina. **Methods:** ON-OFF DS-RGCs were injected with Lucifer yellow and the cells were identified by their characteristic morphology. To identify glutamatergic excitatory input from bipolar cell, we used a marker for the membrane traffic motor protein kinesin. **Results:** We identified DS-RGCs in P5, and P10 mouse retina. The immunofluorescence labeling of NMDA R1 was most prominent in the IPL. Our results showed that their presence upon the entire dendritic arbor of ON-OFF DS-RGCs is without any evidence of asymmetry, which would predict direction selectivity. **Conclusions:** The glutamatergic input from bipolar cell reveals symmetry pattern in all periods of P5, and P10. The results may suggest that direction selectivity not lies in the specific pattern of NMDA R1 receptors.

Key words: Direction selectivity, NMDA receptor, Synaptic pattern, Retinal ganglion cell, Single cell injection, Immunocytochemistry