

MELANOPSYNA – NOWO ODKRYTY CHRONOBIOLOGICZNY RECEPTOR ŚWIATŁA*

MELANOPSIN: A NEWLY DISCOVERED PHOTORECEPTOR
CONTROLLING CIRCADIAN RHYTHMS

Jolanta B. ZAWILSKA^{1,2}, Karolina CZARNECKA¹

¹Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego,
²Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Streszczenie: Siatkówka oka jest tkanką wyspecjalizowaną do odbioru informacji świetlnej. W oku kręgowców występują dwa anatomicznie i funkcjonalnie odmienne szlaki odbioru światła. Pierwszy z nich, oparty na fotodetekcji pręcików i czopków, służy do tworzenia obrazów (tzw. fotodetekcja wzrokowa). W drugim układzie fotony światła są wychwytywane przez melanopsynę, nowo odkryty barwnik wzrokowy z rodziny opsyn. Układ ten rejestruje zachodzące w czasie zmiany w intensywności promieniowania i uczestniczy w tzw. niewzrokowych odpowiedziach na światło (regulacja rytmów biologicznych, odruch zwężenia źrenicy). Przypuszcza się, że w dojrzałej siatkówce systemy widzenia wzrokowego i niewzrokowego wzajemnie ze sobą współpracują. U ssaków melanopsyna występuje w małej subpopulacji światłoczułych komórek zwojowych siatkówki (ipRGCs), które dzięki rozbudowanemu drzewu dendrytycznemu mogą zbierać informacje świetlne z obszaru całej siatkówki. W rozwoju osobniczym ssaków tzw. widzenie niewzrokowe, pozwalające na synchronizację rytmów okołodobowych z warunkami oświetlenia środowiska, pojawia się jako pierwsze, wyprzedzając rozwój klasycznego systemu wzrokowego. Podobnie jak opsyny bezkręgowców, melanopsyna prawdopodobnie pełni podwójną funkcję fotobarwnika i fotoizomerazy retinalu. W komórkach zawierających melanopsynę pod wpływem światła dochodzi do długo utrzymującej się depolaryzacji, będącej wynikiem aktywacji białka G_q/G_{11} i fosfolipazy C. Obserwowany wzrost stężenia jonów Ca^{2+} zależy zarówno od uruchomienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, jak i otwarcia kanałów kationowych typu TRPC.

Słowa kluczowe: melanopsyna, komórki zwojowe siatkówki, pręciki, czopki, siatkówka, widzenie, rytmy okołodobowe.

Summary: The visual system is now known to be composed of two anatomically and functionally distinct pathways, i.e. the image-forming and non-image-forming. Photoreception of the image-forming pathway

*Praca finansowana przez MEiN (grant nr 2 PO6D 025 29) i Uniwersytet Medyczny w Łodzi (projekt nr 502-13-409).

begins with rods and cones, classical photoreceptors, whereas that for the non-image-forming pathway is predominantly based on intrinsically photosensitive retinal cells containing the newly discovered photopigment – melanopsin. The non-image-forming visual system poorly responds to brief light stimuli, and by integrating photic energy over longer periods of time it is capable of controlling various circadian rhythms. Accumulating experimental evidence suggests that at least in mammals the non-image-forming and image-forming pathways are merged, and influence the activity of each other. In mammals, melanopsin is expressed in a small population of intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells (ipRGCs). The ipRGCs are light responsive from birth, long before the functional development of classical photoreceptors and the image-forming visual pathway. The photosensitivity of melanopsin relies on the presence of *cis*-isoforms of retinaldehyde. By analogy to invertebrate opsins, melanopsin acts as a bistable pigment, having both sensory and photoisomerase regeneration functions. The transduction pathway triggered by melanopsin results in a sustained increase in intracellular calcium. This calcium increase is mediated through a G_q/G_{11} – phospholipase C – IP_3 pathway, and additionally involves activation of nonselective cation channels TRPC.

Key words: melanopsin, retinal ganglion cells, rods, cones, retina, vision, circadian rhythms.

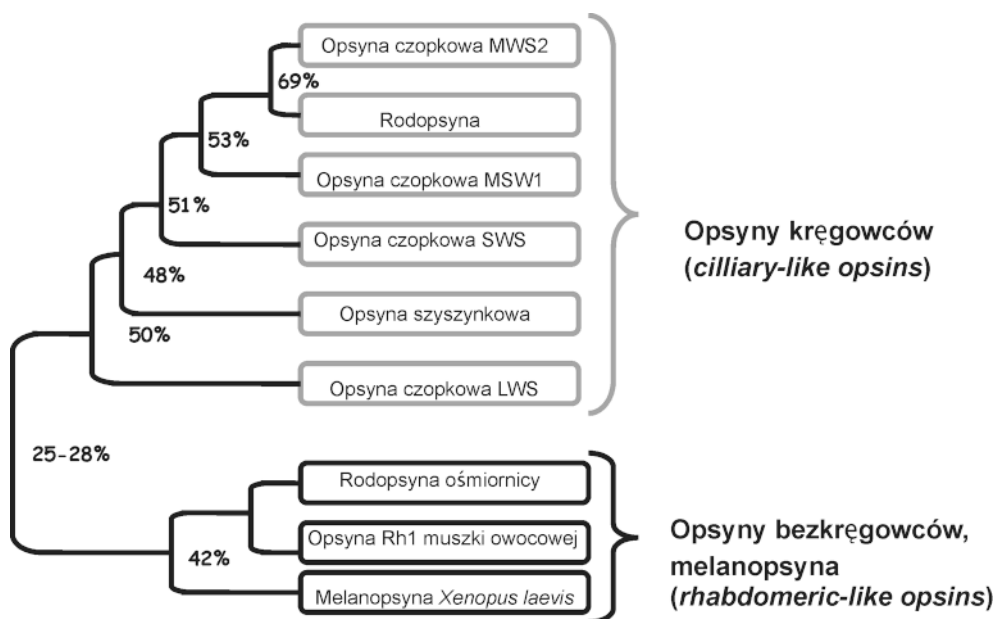
WSTĘP

Siatkówka oka jest tkanką wyspecjalizowaną do odbioru informacji świetlnej. Do niedawna uważano, że jedynymi fotoreceptorami w siatkówce kręgowców są pręciki i czopki. Segmenty zewnętrzne tych komórek, zawierające barwniki wzrokowe z rodziny opsyn, po pochłonięciu fotonów światła uruchamiają kaskadę procesów, w której sygnał świetlny przekształcany jest w sygnały neuronalne. Sygnały te, po integracji i modulacji w warstwach neuronalnych siatkówki, są zbierane przez komórki zwojowe i następnie przesyłane nerwem wzrokowym do mózgu. Pierwsze informacje wskazujące na obecność w oku dodatkowego systemu detekcji światła, który wykorzystuje receptory inne niż czopki i pręciki, pojawiły się w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. Pochodziły one z badań nad mechanizmami świetlnej regulacji rytmów okołodobowych. W doświadczeniach przeprowadzonych na zmodyfikowanych genetycznie szczepach myszy (*rd/rd*, *rd/rd cl*) wykazano, że utrata pręcików i czopków nie zmienia chronobiologicznych odpowiedzi zwierząt na światło (takich jak: supresja nocnych poziomów melatoniny, hamowanie nocnej aktywności ruchowej, synchronizacja rytmu aktywności ruchowej do cyklu oświetlenia, przesunięcia faz okołodobowego rytmu aktywności ruchowej), a także nie wpływa na odruch zwężenia źrenicy pod wpływem światła [7,16,17,37,39,-45,69]. Ponadto, w badaniach klinicznych zaobserwowano, że u niektórych osób niewidomych zachowana jest zdolność do regulacji przez światło syntezy melatoniny, rytmu sen-czuwanie oraz dobowych oscylacji poziomów kortyzolu w osoczu [10,36]. Te pionierskie prace stanowiły podstawę do wysunięcia hipotezy, że przynajmniej w siatkówkach ssaków występuje nieopisany dotąd system odbioru i kodowania informacji świetlnej. System ten, w przeciwieństwie do układu opartego na fotodetekcji klasycznych fotoreceptorów i wykorzystywanego do tworzenia obrazów (tzw. fotodetekcja wzrokowa; *image-forming photoreceptor system* lub *visual photoreceptor system*), służy do pomiaru zmieniającej się w czasie intensywności promieniowania świetlnego i odbiera fotony światła w innych celach niż tworzenie obrazów wzrokowych

(*non-image-forming photoreceptor system; non-visual photoreceptor system*). Wyniki kilkuletnich poszukiwań niewzrokowych (okołodobowych) fotoreceptorów pozwalają sądzić, że u ssaków rolę tę pełni mała populacja komórek zwojowych wykorzystująca nowo odkryty barwnik – melanopsynę [5,6,15,16,34,56,63].

BUDOWA MELANOPSYNY

Melanopsynę po raz pierwszy sklonowano w 1998 r. z mRNA pochodzącego z melanoforów skóry żaby szponiastej (*Xenopus laevis*); cechą charakterystyczną tych komórek jest bezpośrednia wrażliwość na światło [51]. Nazwa melanopsyna (ang. *melanopsin*) odzwierciedla zarówno pierwotne źródło izolacji peptydu, jak i fakt, że należy on do grupy opsyn. Gen kodujący melanopsynę oznaczono symbolem *Opn4* [51]. Melanopsyna *Xenopus* zbudowana jest z 534 reszt aminokwasowych (aa). U kurczęcia wykryto dwa geny kodujące melanopsynę – *cOpn4-a* i *cOpn4-b*, których ekspresja jest zróżnicowana. Dominujący *cOpn4-a* koduje białko zbudowane z 543 aa. Z kolei *cOpn4-b*, który w porównaniu z *cOpn4-a* po nukleotydzie 1242 ma sekwencję 86 par



RYCINA 1. Schemat drzewa filogenetycznego opsyn opartego na budowie struktury I-rzędowej domen transbłonowych TM1-7 białek. Dane dla opsyn kręgowców przedstawiają stopień podobieństwa pomiędzy opsynami kurczęcia: MWS1 (ang. *middle-wavelength-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie niebieskie; MWS2 (ang. *middle-wavelength-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie zielone; SWS (ang. *short-wave-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie fioletowe; LWS (*long-wave-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie czerwone. Wartości liczbowe przedstawiają procent homologii struktury I-rzędowej pomiędzy poszczególnymi opsynami [16,51]

zasad z „przedwczesnym” kodonem stop, odpowiada za syntezę krótszego białka zbudowanego z 425 aa [67]. Także u przedstawiciela gromady ryb – dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*) występują dwa odrębne geny kodujące syntezę melanopsyny, *Opn4a* i *Opn4b*, o zróżnicowanej ekspresji tkankowej i komórkowej [12]. Dotychczas sklonowane melanopsyny kręgowców (dorsza, danio pręgowanego, żaby szponiastej, kurczęcia, myszy, szczura, człowieka) wykazują znacznie więcej homologii strukturalnej z opsynami bezkręgowców (około 40%) niż z opsynami kręgowców (do 30%) [4,9,12,16,28,51,52]. Analiza filogenetyczna wskazuje na to, że melanopsyna i opsyny bezkręgowców prawdopodobnie wywodzą się od wspólnego przodka [51]. W obrębie rodziny scharakteryzowanych dotychczas melanopsyn stopień homologii struktury I-rzędowej dla białek różnych gatunków kręgowców wynosi 60–70%.

Szczegółowa analiza budowy melanopsyny wskazuje, że należy ona do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G [31,51]. Łańcuch białkowy siedmiokrotnie przechodzi przez błonę komórkową tworząc w obrębie błony siedem hydrofobowych domen transbłonowych (TM) połączonych naprzemiennie pętlami cytoplazmatycznymi i zewnątrzkomórkowymi. *N*-końcowy fragment białka znajduje się w obszarze zewnątrzkomórkowym, a fragment *C*-końcowy w cytoplazmie. Podobnie jak u innych opisanych dotychczas białek z rodziny opsyn, w siódmej domenie TM melanopsyny występuje lizyna (Lys²⁹⁴), do której przyłącza się chromofor (najprawdopodobniej 11-*cis*-retinal) tworząc zasadę Schiffa. Reszty cysteinowe (Cys¹⁰⁰ i Cys¹⁷⁸), obecne w drugiej i trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej, uczestniczą w tworzeniu mostka dwusiarczkowego stabilizującego strukturę III-rzędową białka. W obrębie *N*-końca melanopsyny nie występują natomiast miejsca *N*-glikozylacji, które są charakterystyczne dla innych opsyn. Melanopsyna *Xenopus*, podobnie jak i sklonowane później melanopsyny innych gatunków zwierząt, ma długi *C*-koniec, w którym występują liczne miejsca (kilkanaście) mogące ulegać fosforylacji. Sugeruje to możliwość regulacji aktywności białka przez kinazy. Analogicznie do opsyn bezkręgowców, melanopsyna ma w trzeciej domenie transbłonowej (TM3) aromatyczny aminokwas – tyrozynę (Tyr¹⁰³), która może uczestniczyć w stabilizacji zasady Schiffa. Z kolei w trzeciej pętli cytoplazmatycznej obecny jest charakterystyczny fragment Asn²²⁵ – Gly²³³, wstawka ta nie występuje w opsynach kręgowców [51]. Budowa tej pętli w znacznym stopniu determinuje rodzaj białka G, na który będzie przenoszony sygnał z receptora światła, jakim jest opsyna. Obecność fragmentu Asn²²⁵ – Gly²³³ w białku melanopsyny sugeruje, że uruchamiany przez nią szlak transdukcji sygnału może być analogiczny do szlaku aktywowanego przez opsyny bezkręgowców. Słuszność powyższej hipotezy potwierdziły wyniki najnowszych badań przeprowadzonych na oocytach *Xenopus laevis* i liniach komórkowych, w których dokonano ekspresji genu *Opn4* [41,47,54].

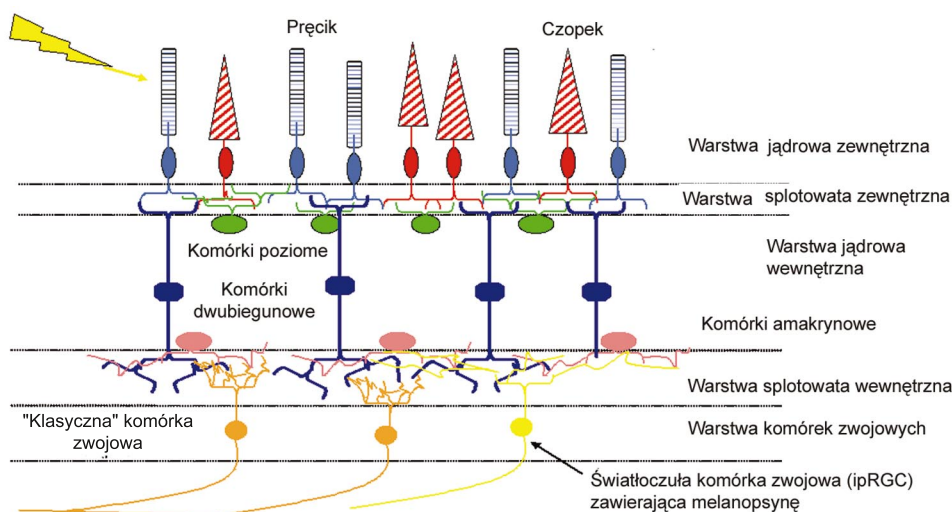
WYSTĘPOWANIE

Wykorzystując techniki immunohistochemiczne oraz hybrydyzacji *in situ* obecność melanopsyny wykazano w melanoforach skóry, oku (siatkówce, nabłonku barwnikowym

siatkówki – RPE i w tęczówce) i w mózgu (jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza i wielkokomórkowym jądrze przedwzrokowym) *Xenopus laevis* [51]. U dorsza atlantyckiego ekspresję genu *Opn4a* stwierdzono w siatkówce i w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza, natomiast ekspresję genu *Opn4b* – w siatkówce i w uzdeczce [12]. U kury (*Gallus domesticus*) melanopsyna występuje w siatkówce, szyszynce i mózgu (przegrodzie, uzdeczce, wzgórzu, prążkowie, jądrze przedwzrokowym, obszarze pomiędzy jądrem okrągłym a jądrem kolankowatym bocznym oraz obszarze pomiędzy pokrywą wzrokową a jądrem soczewkowatym śródmózgowia) [1,9,67]. Obecność melanopsyny stwierdzono ponadto w siatkówkach ssaków (myszy, szczura, kretoszczura, chomika, kota, makaka, człowieka) i ryby (danio pręgowany; ang. *zebrafish*) [4,11,13,22–26, 28,43,49,52,53,62]. Należy podkreślić, że w obrębie siatkówki rozmieszczenie melanopsyny wykazuje bardzo duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi gromadami kręgowców. U płazów (*Xenopus laevis*) obecność melanopsyny stwierdzono w RPE, zewnętrznej części warstwy jądrowej wewnętrznej i w nielicznych komórkach zwojowych [51]. W siatkówkach ryb¹ melanopsyna występuje w komórkach poziomych i amakrynowych (warstwa jądrowa wewnętrzna) oraz w komórkach zwojowych [4,12]. U ptaków (kura domowa) obecność melanopsyny wykazano głównie w warstwie jądrowej wewnętrznej siatkówki (przypuszczalnie w perikarionach komórek poziomych i dwubiegunowych), a ponadto w warstwie jądrowej zewnętrznej (komórki fotoreceptorowe) i, w znacznie mniejszym stopniu, w komórkach zwojowych oraz w RPE [9,67]. Z kolei u ssaków melanopsyna występuje przede wszystkim w komórkach zwojowych siatkówki oraz w pojedynczych komórkach amakrynowych położonych pomiędzy warstwą komórek zwojowych a warstwą jądrową wewnętrzną [3,11,13,20,24,-26,28,49,52,53].

Badania przeprowadzone w okresie ostatnich kilku lat wykazały, że w siatkówkach ssaków występuje mała (licząca, w zależności od gatunku i wieku, od ułamka do kilkunastu procent ogólnej liczby) populacja komórek zwojowych mających zdolność do bezpośredniego pochłaniania fotonów światła (ang. *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*; ipRGCs). Komórki te odgrywają kluczową rolę w regulacji tzw. niewzrokowych odpowiedzi na światło (ang. *non-visual photic responses*; *non-image forming photic responses*), takich jak: hamowanie syntezy melatoniny, regulacja okołodobowego rytmu aktywności ruchowej, zwięźanie źrenicy [5,6,18,30,38]. Co najmniej 80% ipRGCs zawiera melanopsynę [5]. W siatkówce człowieka komórki zawierające melanopsynę stanowią 0,2–0,8% całkowitej populacji komórek zwojowych. Ich gęstość wynosi 3–5 komórek/mm² na obwodzie siatkówki i 20–25 komórek/mm² w części dołkowej [11]. W siatkówkach ssaków, w tym także w siatkówce człowieka, przeważająca część komórek zwojowych zawierających melanopsynę wykazuje koekspresję PACAP [13,24,26] – polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylanową (ang. *pituitary adenylate cyclase – activating polypeptide*). Należy podkreślić, że PACAP jest uważany za neurochemiczny marker szlaku siatkówkowo-

¹U dorsza atlantyckiego ekspresję genu *Opn4a* zaobserwowano w komórkach poziomych, amakrynowych i zwojowych siatkówki, a ekspresję genu *Opn4b* – w komórkach amakrynowych i zwojowych [12].



RYCINA 2. Schemat budowy siatkówki ssaków. Światłoczułe komórki zawierające melanopsynę wyróżniają się z grupy komórek zwojowych rozbudowanym drzewem dendrytycznym. Komórki te mogą odbierać sygnały pochodzenia czopkowego i pręcikowego. Pozostałe objaśnienia w tekście ([5,63] zmodyfikowano)

podwzgórzowego [21]. Melanopsyna występuje w błonie komórkowej subpopulacji komórek zwojowych, głównie w obrębie dendrytów oraz perikarionów [24,28]. Perikariony nielicznych komórek melanopsynowych znajdują się w warstwie jądrowej wewnętrznej [28]. Najbardziej uderzającą cechą morfologiczną ipRGCs jest ich szerokie drzewo dendrytyczne, najbardziej rozbudowane w grupie wszystkich komórek zwojowych. Większość komórek zwojowych zawierających melanopsynę ma dwa lub trzy główne, długie dendryty rozgałęziające się w warstwie spłotowatej wewnętrznej [3,5]. Wypustki dendrytyczne melanopsynowych komórek zwojowych nakładają się na siebie i tworzą gęstą sieć obejmującą cały obszar siatkówki. Fotorecepcyjne drzewo dendrytyczne pojedynczej ipRGC pokrywa obszar około $500 \mu\text{m}^2$, podczas gdy powierzchnia zajmowana przez światłoczuły segment zewnętrzny pręcika lub czopka to około $1 \mu\text{m}^2$ [5]. Dendryty komórek zwojowych zawierających melanopsynę docierają do warstwy spłotowatej wewnętrznej oraz, w znacznie mniejszym stopniu, do warstwy jądrowej wewnętrznej [3,5,11,26,28]. W obrębie warstwy spłotowatej wewnętrznej dendryty tych komórek są położone postsynaptycznie w stosunku do zakończeń komórek dwubiegunowych i amakrynowych, co wskazuje na możliwość modulacji funkcji ipRGCs przez sygnały pochodzenia pręcikowego bądź czopkowego [3].

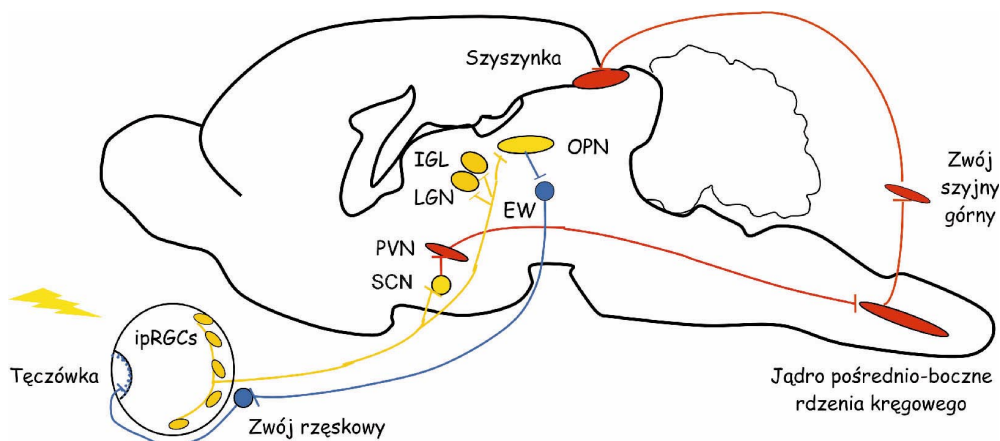
U ssaków komórki zwojowe zawierające melanopsynę [5,11,26,28,43] wysyłają swoje aksony do :

- (1) jąder nadskrzyżowaniowych przedniej części podwzgórza (ang. *suprachiasmatic nuclei*; SCN) – struktury uważanej za miejsce głównego zegara biologicznego ssaków;

- (2) kompleksu ciała kolankowatego bocznego – głównie do listka ciała kolankowatego bocznego (ang. *intergeniculate leaflet*; IGL), który uczestniczy w modulacji rytmów okołodobowych;
- (3) przedpokrywowego jądra oliwki (ang. *olivary pretectum nucleus*; OPN), odpowiedzialnego za odruch zwięzania źrenicy pod wpływem światła;
- (4) brzuszno-bocznego jądra przedwzrokowego (ang. *ventrolateral preoptic nucleus*; VLPO) – struktury zaangażowanej w kontrolę rytmu sen-czuwanie;
- (5) brzusznej części obszaru okołokomorowego (ang. *ventral subparaventricular zone*; vSPZ) – rejonu mózgu uczestniczącego w kompleksowej regulacji rytmów okołodobowych. U gryzoni obszar ten najprawdopodobniej odgrywa zasadniczą rolę w procesie hamowania przez światło nocnej aktywności ruchowej (tzw. *negative masking*).

DOBOWE/OKOŁODOBOWE ZMIANY EKSPRESJI MELANOPSYNY

W siatkówce szczura stopień ekspresji melanopsyny zmienia się rytmicznie w ciągu doby [58,59]. U zwierząt przebywających w cyklicznie zmieniających się warunkach oświetlenia (12 godz. światła : 12 godz. ciemności) najwyższy poziom mRNA dla



RYCINA 3. Światłoczułe komórki zwojowe zawierające melanopsynę (ipRGCs) wysyłają swoje wypustki aksonu do ośrodków kontrolujących rytmy okołodobowe, tj. jąder nadskrzyżowaniowych przedniej części podwzgórza (SCN) i do kompleksu ciała kolankowatego bocznego (jądra ciała kolankowatego bocznego – LGN oraz listka ciała kolankowatego bocznego – IGL), a także do przedpokrywowego jądra oliwki (OPN), które odpowiada za odruch zwięzania źrenicy. Struktury te zaznaczone zostały na schemacie kolorem żółtym. Chronobiologiczny sygnał świetlny z SCN jest przesyłany do szyszynki szlakiem wieloneuronalnym zaznaczonym na kolor czerwony; PVN (ang. *paraventricular nucleus*) – jądro przykomorowe podwzgórza. Szlak neuronalny kontrolujący proces zwięzania źrenicy, w skład którego wchodzi OPN, jądro Edingera-Westphala (EW), zwój rzęskowy, przed- i zwojowe włókna przywspółczulne oraz tęczówka, został zaznaczony kolorem niebieskim (wg [5] zmodyfikowano)

melanopsyny zaobserwowano pod koniec fazy jasnej i na początku fazy ciemnej cyklu, a najniższy pod koniec fazy ciemnej i w pierwszej połowie fazy jasnej. Z kolei immunoreaktywność melanopsynowa, odzwierciedlająca poziom białka, była najwyższa w połowie fazy ciemnej, a najniższa w połowie fazy jasnej. Rytmiczne zmiany ekspresji melanopsyny utrzymywały się w siatkówkach szczurów przebywających w warunkach stałej ciemności, co wskazuje, że jest to rytm okołodobowy. Degeneracja pręcików i czopków (badania na szczurach RCS/N-*rdy*⁻) pociągała za sobą dramatyczny (>90%) spadek poziomów mRNA dla melanopsyny i immunoreaktywności melanopsynowej oraz zanik rytmicznych zmian w ekspresji melanopsyny [59]. Z kolei chemiczne zniszczenie neuronów siatkówkowych, których perikariony tworzą warstwę jądrową wewnętrzną, prowadziło do zmniejszenia amplitudy zmian poziomów mRNA dla melanopsyny w siatkówkach szczurów trzymanyh w cyklicznie zmieniających się warunkach oświetlenia, a także do zaniku okołodobowego rytmu mRNA [58]. Przypuszcza się, że w regulacji ekspresji melanopsyny (a także neuropeptydu PACAP, który współwystępuje z melanopsyną w światłoczułych komórkach zwojowych) w siatkówce szczura istotną rolę odgrywają z jednej strony klasyczne fotoreceptory (pręciki i czopki), a z drugiej – siatkówkowe obwody neuronalne. Sugeruje się ponadto znaczący udział dopaminergicznych komórek amakrynowych i receptorów D₂-dopaminowych (znajdujących się na ipRGCs) w kontroli rytmicznych zmian poziomów melanopsyny w siatkówce szczura [58].

W siatkówce i szyszynce kury poziomy mRNA dla melanopsyny zmieniają się w rytmach okołodobowych o przeciwstawnych fazach. Na początku fazy jasnej w siatkówce obserwowano najwyższą ekspresję melanopsyny, natomiast w szyszynce najniższą. Z kolei w czwartej godzinie fazy ciemnej poziomy mRNA dla melanopsyny w siatkówce były najniższe, a w szyszynce najwyższe [9]. W obrębie warstw siatkówki wyższe „dzienne” poziomy mRNA stwierdzono w RPE i w warstwie jądrowej wewnętrznej, dobowy profil zmian w fotoreceptorach był analogiczny do profilu szyszynkowego, a ekspresja melanopsyny w warstwie komórek zwojowych utrzymywała się na zbliżonym poziomie w ciągu doby [9].

SZLAKI TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Scharakteryzowane dotychczas światłoczułe opsyny bezkręgowców i kręgowców należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G i jako chromofory wykorzystują 11-*cis*-retinal lub jego homolog [27,35,50]. Pochłonięcie fotonu światła wywołuje konwersję 11-*cis*-retinalu do całkowicie-*trans*-retinalu, co pociąga za sobą zmianę konformacji przestrzennej opsyny, a następnie aktywację białka G i odpowiedniego szlaku transdukcji sygnału. U kręgowców opsyny „współpracują” z wrażliwą na toksynę krztuśca transducyną (G_t), natomiast u bezkręgowców – z białkami G_q, które nie są wrażliwe na toksynę krztuśca [27,35,50]. Warunkiem niezbędnym do odbudowy zdolności barwnika wzrokowego do ponownej fotodetekcji jest regeneracja chromoforu. U kręgowców po odłączeniu całkowicie-*trans*-retinalu od opsyny, w złożonym,

wieloetapowym procesie zachodzącym w RPE dochodzi do przekształcenia całkowicie-*trans*-retinalu do 11-*cis*-retinalu [35]. Z kolei opsyny bezkręgowców wykorzystują energię z pochłoniętych fotonów światła do izomeryzacji całkowicie-*trans*-retinalu, a w procesie tym uczestniczy arestyna [33]. Opsyny bezkręgowców działają zatem także jako fotoizomerazy.

Dla zrozumienia roli fizjologicznej melanopsyny istotne było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

- (1) jakie zmiany elektrofizjologiczne zachodzą pod wpływem światła w komórkach zawierających melanopsynę,
- (2) jaki chromofor jest niezbędny do fotodetekcyjnej roli melanopsyny,
- (3) jakiego typu białko G jest aktywowane przez melanopsynę,
- (4) jaki szlak/szlaki transdukcji sygnału są uruchamiane w wyniku fotodetekcji światła przez melanopsynę,
- (5) czy melanopsyna, poprzez analogię z opsynami bezkręgowców, może pełnić rolę fotoizomerazy.

Badania przeprowadzone na oocytach *Xenopus laevis* [47] i dwóch liniach komórkowych, Neuro-2a [41] i HEK293 [54], w których dokonano ekspresji cDNA kodującego melanopsynę, pozwoliły sformułować hipotezę, w jaki sposób pracują komórki melanopsynowe. Po pierwsze udowodniono, że komórki zawierające melanopsynę są bezpośrednio światłoczułe. Pod wpływem ekspozycji na światło dochodzi w nich do opóźnionej, ale jednocześnie długo utrzymującej się depolaryzacji błony komórkowej². Analiza spektralna wskazuje, że efekt taki wywiera światło o długości fali około 480 nm [47,52]. Należy podkreślić, że światło o takiej długości fali aktywuje ipRGCs [5]. Warunkiem niezbędnym do detekcji fotonów światła przez melanopsynę jest obecność chromoforu – 11-*cis*-retinalu (bądź jego analogu 9-*cis*-retinalu)[19,30,47]. Melanopsyna zachowuje zdolność do fotodetekcji również w obecności całkowicie-*trans*-retinalu. Sugeruje to, że podobnie jak opsyny bezkręgowców może ona pełnić podwójną rolę – fotopigmentu i fotoizomerazy retinalu. Przebiegający przy udziale melanopsyny proces fotoizomeryzacji całkowicie-*trans*-retinalu prawdopodobnie zależy od arestyny [47]. Badania przeprowadzone na genetycznie zmodyfikowanych myszach pozbawionych genu kodującego białko odpowiedzialne za regenerację retinalu w komórkach RPE (*rpr65^{-/-}*), u których analizowano wywołane przez światło zmiany szerokości źrenicy (badania behawioralne) oraz zmiany potencjału błony komórkowej (badania typu *current clump* i *voltage clump* pojedynczych komórek zwojowych siatkówki), stanowią dowód potwierdzający słuszność hipotezy, że melanopsyna występująca w ipRGCs jest zarówno barwnikiem wzrokowym jak i fotoizomerazą [19].

Przypuszcza się, że pochłonięcie fotonów światła przez kompleks melanopsyna – 11-*cis*-retinal prowadzi do aktywacji białka G_q/G_{11} z następującą stymulacją fosfolipazy C (PLC) i wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów wapniowych ($[Ca^{2+}]_i$), wywołującym tzw. falę wapniową [41,47,54]. Do tej pory nie wyjaśniono do

²Pochłonięcie fotonów światła przez opsyny pręcików i czopków prowadzi do bardzo szybkiej i krótkotrwałej hiperpolaryzacji błony komórkowej, będącej wynikiem zamknięcia zależnych od cGMP kanałów kationowych w segmentach zewnętrznych komórek [35,50].

TABELA 1. Różnice pomiędzy klasycznymi fotoreceptorami (pręcikami i czopkami) a światłoczułymi komórkami zwojowymi (ipRGCs) w siatkówce ssaków

	Pręciki i czopki	Światłoczułe komórki zwojowe
Lokalizacja ciała komórki	Warstwa jądrowa zewnętrzna	Głównie warstwa komórek zwojowych, rzadko warstwa jądrowa wewnętrzna
Zakończenia aksonów docierają do	Komórki dwubiegunowe i komórki poziome siatkówki	Mózg: SCN, OPN, LGN, IGL, VLPO, obszar okołokomorowy
Liczba komórek w dojrzałej siatkówce (dane dla człowieka)	Około 3.000.000	Około 3000
Pole recepcyjne	Małe	Rozległe
Elementy fotorecepcyjne komórki	Segmenty zewnętrzne	Perikarion, dendryty, akson (?)
Barwnik wzrokowy	Pręciki – rodopsyna, czopki – opsyny czopkowe	Melanopsyna
λ_{maks} (nm; dane dla siatkówki człowieka)	Pręciki – 497; czopki: SWS – 414, MWS – 530; LWS – 560	480
Odpowiedź na światło	Szybka, przejściowa (<i>transient</i>) hiperpolaryzacja	Wolna, utrzymująca się depolaryzacja
Potencjał czynnościowy	Nie	Tak
Szlak transdukcji sygnału po absorpcji fotonów światła	Białko $G_t \rightarrow PDE \rightarrow cGMP \rightarrow Ca^{2+} \downarrow$	Białko $G_q/G_{11} \rightarrow PLC \rightarrow Ca^{2+} \uparrow$

SCN – jądro nadskrzyżowaniowe podwzgórza, OPN – przedpokrywowe jądro oliwki; LGN – jądro ciała kolankowatego bocznego, IGL – listek ciała kolankowatego bocznego, VLPO – brzuszoboczne jądro przedwzrokowe; PDE – fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów; PLC – fosfolipaza C; \uparrow – wzrost; \downarrow – spadek

końca, w jaki sposób aktywacja PLC uruchamia falę wapniową w komórce zawierającej melanopsynę. Prawdopodobnie w procesie tym uczestniczy inozytolo-1,4,5-trisfosforan (IP_3), powstały w wyniku działania PLC, który uruchamia wewnętrzkomórkowe magazyny Ca^{2+} i podnosi stężenie $[Ca^{2+}]_i$ w komórce [32]. Sugeruje się ponadto, że w powstawaniu fali wapniowej istotną rolę odgrywają przepuszczalne dla Ca^{2+} , nieselektywne kanały kationowe TRPC (ang. *transient receptor potential cation channels*) [47,54]. Budowa i funkcja kanałów TRPC jest zbliżona do kanałów typu Trp i Trp1, które występują w fotoreceptorach muszki owocowej i uczestniczą w procesie fototransdukcji [42].

Najnowsze badania wykazały, że podobnie jak w przypadku klasycznych fotoreceptorów [14,35], wrażliwość ipRGCs na światło ulega plastycznym zmianom w odpowiedzi na utrzymujące się stałe warunki oświetlenia [71]. W tzw. procesie adaptacji do światła, w czasie ekspozycji na światło o jednakowym natężeniu promieniowania dochodzi do stopniowego zmniejszania odpowiedzi elektrofizjologicznej komórek, czyli do ich desensytyzacji. Nowe bodźce świetlne, o wyższym natężeniu promieniowania niż wcześniejsze „tło”, do którego zaadaptowały się komórki, będą indukowały odpowiedzi o wzrastającej amplitudzie, dochodzi wówczas do resensytyzacji ipRGCs. Z kolei proces adaptacji do ciemności polega na stopniowej, trwającej nawet kilka godzin, pełnej odbudowie fotowrażliwości ipRGCs. Proces ten obserwuje się w komórkach siatkówek, które po długotrwałej ekspozycji na światło umieszczono w ciemności [71]. Przypuszcza się, że adaptacyjne zmiany ipRGCs do panujących warunków oświetlenia są najprawdopodobniej wynikiem zmian w szlaku przepływu sygnału z melanopsyny na kanały kationowe, a nie zmian w pracy samych kanałów. Fizjologiczne znaczenie zjawiska plastyczności ipRGCs jest dotychczas nieznanne. Być może zdolność ipRGCs do zmian adaptacyjnych w odpowiedzi na „historię” oświetlenia siatkówki pozwala im rozpoznawać i kodować zmiany w natężeniu oświetlenia w bardzo szerokim zakresie charakterystycznym dla zmian zachodzących w ciągu dnia (np. światło o wschodzie słońca – światło w południe – światło o zachodzie słońca) oraz o różnych porach roku. Umożliwiałoby to kluczowy udział tych komórek w regulacji zależnych od światła procesów chronobiologicznych przebiegających na długiej przestrzeni czasu (rytmy okołodobowe, rytmy sezonowe) [71].

ZMIANY EKSPRESJI MELANOPSYNY W PRZEBIEGU ROZWOJU OSOBNICZEGO

Oprócz systemu transdukcji sygnału i zdolności do fotoizomeryzacji chromoforu, kolejną cechą, która odróżnia melanopsynę od klasycznych opsyn pręcików i czopków, są zmiany w stopniu ekspresji tego białka w przebiegu rozwoju siatkówki. Melanopsyna pojawia się w rozwoju embrionalnym bardzo wcześnie, znacznie wyprzedzając rozwój pręcików i czopków (a następnie specyficznych dla tych fotoreceptorów opsyn) oraz nerwu wzrokowego. Ekspresję melanopsyny, podobnie jak i innych opsyn, które nie są związane

z pręcikami i czopkami: peropsyny, encefalopsyny i RGR-opsyny (ang. *retinal G-protein coupled receptor opsin*) [34], wykryto już u 9-tygodniowych płodów ludzkich [65].

Badania morfologiczne i elektrofizjologiczne dowodzą, że sygnalizacja wzrokowa w oku myszy pojawia się dopiero w dziesiątym dniu po urodzeniu (P10) [2,55]. U myszy pręciki i czopki powstają w czasie rozwoju embrionalnego, ale dojrzewają anatomicznie i funkcjonalnie dopiero w okresie postnatalnym [60,65]. Różnicowanie czopków opisano u 10-dniowych zarodków (E10), natomiast ekspresję genu kodującego opsyne UVS/VS w P1, a opsyne LWS – w P7. Z kolei różnicowanie pręcików w siatkówce myszy zachodzi w E12, ale ekspresja genu kodującego opsyne pręcikową jest wykrywalna dopiero w P5. Ponadto, błony segmentów zewnętrznych pręcików i czopków pojawiają się po raz pierwszy w P4-P6 i dojrzewają w pełni w P20. W okresie pomiędzy P10 i P20 obserwuje się dojrzewanie i akumulację w siatkówce myszy estru 11-*cis*-retinyli – prekursora 11-*cis*-retinalu. Powyższe zmiany rozwojowe korelują w czasie z pojawieniem się odpowiedzi ON/OFF komórek zwojowych siatkówki myszy na światło.

Ekspresję melanopsyny w siatkówce myszy stwierdzono już w E10, tj. w tym samym czasie, kiedy w rozwoju embrjonalnym tego gatunku pojawiają się komórki zwojowe siatkówki [60]. W siatkówkach wyizolowanych od noworodków mysich gęstość komórek zwojowych zawierających melanopsynę wynosiła 182/mm², u myszy 4-dniowych – 226/mm², natomiast u myszy 14-dniowych – tylko 63/mm² [60]. Zmiany liczby komórek zwojowych zawierających melanopsynę opisano także w przebiegu rozwoju siatkówki szczura [13]. Słaby sygnał, obecny w warstwie neuroblastycznej wewnętrznej, wskazujący na immunoreaktywność melanopsynową zarejestrowano najwcześniej w E18. Następnie liczba komórek melanopsynowych wzrastała aż do drugiego tygodnia życia. Komórki te występowały w warstwie komórek zwojowych. Należy podkreślić, że u szczurów w wieku od 1 do 12 dni ekspozycja na światło prowadziła do ekspresji c-Fos wyłącznie w tych komórkach zwojowych siatkówki, które zawierały melanopsynę [13,22,23].

W kontekście potencjalnej roli fizjologicznej melanopsyny i ipRGCs za niezwykle ważne można uznać wyniki badań nad rozwojowymi zmianami w elektrofizjologicznej odpowiedzi komórek zwojowych na światło. Badania te przeprowadzono na myszach dzikich i myszach z knockoutem genu kodującego melanopsynę (*Opn4^{-/-}*) [60]. W siatkówkach pobranych od myszy dzikich w wieku P0-P1 w 13,7% komórek zwojowych pod wpływem światła (o długości fali 470 nm) obserwowano zmiany w intensywności fluorescencji FURA-2 odzwierciedlające wzrost [Ca²⁺]_i (falę wapniową). Zdecydowana większość (93%) zarejestrowanych zmian utrzymywała się do końca ekspozycji na światło. W wieku P4-P5 tylko 5,4% komórek zwojowych siatkówki odpowiadało falą wapniową na bodziec świetlny, przy czym około jednej czwartej tych odpowiedzi miało charakter przejściowy (szybki wzrost, a następnie spadek [Ca²⁺]_i). Wyeliminowanie potencjalnych sygnałów z pręcików i czopków (inkubacja siatkówek w obecności antagonistów glutaminergicznych receptorów jonotropowych i agonisty glutaminergicznych receptorów metabotropowych) nie zmieniało liczby komórek zwojowych odpowiadających na światło. Stanowi to dowód na to, że w siatkówce myszy występuje subpopulacja komórek zwojowych charakteryzujących się zdolnością do pochłaniania fotonów światła, a zatem bezpośrednią wrażliwością na światło [60]. Ponieważ w

siatkówkach pobranych od 4-dniowych myszy *Opn4^{-/-}* pod wpływem światła nie rejestrowano zmian w $[Ca^{2+}]_i$, sądzi się, że światłoczułe komórki zwojowe zawierają melanopsynę. W tym miejscu należy podkreślić, że u 4-dniowych myszy dzikich, ale nie u myszy *Opn4^{-/-}*, godzinna ekspozycja na światło indukuje ekspresję c-Fos w SCN [60]. U dorosłych, genetycznie zmodyfikowanych myszy (*rdrd/cl*), u których w wyniku mutacji doszło do zaniku pręcików i czopków, tylko 2,7% neuronów warstwy zwojowej siatkówki w odpowiedzi na światło wykazywało wzrost $[Ca^{2+}]_i$ [60].

Badania elektrofizjologiczne przeprowadzone na wyizolowanych siatkówkach myszy [68] wykazały, że w tkankach pobranych od zwierząt 8-dniowych występują trzy rodzaje światłoczułych komórek zwojowych zawierających melanopsynę. Komórki typu I (72% całej populacji ipRGCs) charakteryzują się długą, kilkusekundową latencją odpowiedzi na światło monochromatyczne ($\lambda_{maks} = 480$ nm; subsaturacyjne natężenie promieniowania) i szybkim zanikiem odpowiedzi elektrofizjologicznej po wyłączeniu światła. Komórki typu II (15%) odpowiadają na bodziec świetlny z kilkusekundowym opóźnieniem, a ich wyładowania elektryczne powoli zanikają po wyłączeniu światła. Komórki typu III (13%) wykazują natomiast bardzo krótki czas latencji i najdłużej utrzymującą się odpowiedź. Wrażliwość na światło komórek typu II była 10-krotnie niższa od wrażliwości komórek typu I i III. Z kolei w siatkówkach myszy 5-tygodniowych występują tylko dwie klasy ipRGCs, którym ze względu na podobieństwa w zapisie odpowiedzi elektrofizjologicznych na światło nadano nazwy „dorosły” typ II i „dorosły” typ III. Przypuszcza się, że w czasie rozwoju siatkówki najprawdopodobniej dochodzi do przekształcenia się komórek typu I w komórki typu II [68].

Na podstawie zgromadzonych danych doświadczalnych przypuszcza się, że w późnym okresie embrionalnego rozwoju siatkówki najprawdopodobniej dochodzi do nadprodukcji światłoczułych komórek zwojowych zawierających melanopsynę, po czym po urodzeniu następuje faza szybkiego ich obumierania, trwająca kilka dni [13,23,60,63,68]. W ciągu dwóch pierwszych tygodni życia prawdopodobnie dochodzi także do intensywnego rozwoju, a następnie zmian morfologicznych drzewa dendrytycznego ipRGCs [13,68]. Od dnia narodzin, czyli zanim funkcjonalnie dojrzeją pręciki i czopki, światło aktywuje grupę komórek zwojowych tworzących szlak siatkówkowo-podwzgórzowy. Komórki te zawierają melanopsynę oraz PACAP; stanowią one podstawowy element odbioru tzw. niewzrokowej informacji świetlnej. W okresie dojrzewania siatkówki, kiedy zmniejsza się populacja komórek zwojowych zawierających melanopsynę, następuje wykształcenie się systemu odbioru informacji świetlnej opartego na fotodetekcji pręcików i czopków. Przypuszcza się, że klasyczne fotoreceptory stopniowo włączają się w system fotodetekcji niewzrokowej i dochodzi do wzajemnej integracji tych dwóch szlaków fotorecepcyjnych – wzrokowego i niewzrokowego [3,8,60,63]. Spadek liczby melanopsynowych ipRGCs obserwuje się także u zwierząt starych [59,61]. Uważa się, że w patomechanizmie zaniku ipRGCs istotną rolę może odgrywać redukcja, a następnie brak modulujących sygnałów ze strony pręcików i czopków. U starych myszy *rd/rd cl* liczba komórek zwojowych zawierających melanopsynę, w których obserwowano ekspresję c-Fos pod wpływem światła, była znamienne niższa niż w siatkówkach myszy dzikich w tym samym wieku [61].

ROLA FIZJOLOGICZNA

Komórki zawierające melanopsynę spełniają wiele kryteriów stawianych potencjalnym kandydatom na fotoreceptory okołodobowe. W przeciwieństwie do klasycznych fotoreceptorów, komórki zawierające melanopsynę (ipRGCs bądź komórki, w których dokonano ekspresji genu *Opn4*) są najbardziej wrażliwe na fale o długości około 480 nm (promieniowanie w tym zakresie wywiera najsilniejsze działanie na układ okołodobowy kręgowców i odruch zwężania źrenicy) oraz kodują energię promieniowania świetlnego i rejestrują zmiany w natężeniu promieniowania zachodzące w ciągu dłuższego czasu [29,38,54]. Obecność melanopsyny w obrębie rozbudowanego drzewa dendrytycznego ipRGCs pozwala na zbieranie informacji świetlnej z obszaru całej siatkówki [28]. Aksony ipRGCs docierają do struktur mózgowych odpowiedzialnych za wytwarzanie i regulację rytmów okołodobowych (SCN, IGL, jąder przedwzrokowych) oraz do OPN – struktury odpowiedzialnej za odruch zwężania źrenicy pod wpływem światła [5,11,20,24,26,28]. Myszy pozbawione genu kodującego melanopsynę (*Opn4^{-/-}*), pomimo prawidłowego rozwoju komórek zwojowych siatkówki, wykazywały znamienne osłabione następujące odpowiedzi behawioralne: zwężenie źrenic pod wpływem światła, indukowane przez światło przesuwanie faz okołodobowego rytmu aktywności ruchowej w warunkach kilkudniowej adaptacji do ciemności, wydłużanie cyklu rytmu aktywności ruchowej w warunkach kilkudniowej adaptacji do światła [29,38–40,44,48,57]. Całkowity zanik tzw. niewzrokowych odpowiedzi na światło obserwowano u myszy homozygotycznych z potrójnym knockoutem (*Opn4^{-/-}, Gnat1^{-/-}, Cnga3^{-/-}*), a więc u zwierząt pozbawionych melanopsyny oraz funkcjonalnej fototransdukcji pręcikowej (knockout genu kodującego podjednostkę α transducyny-1) i fototransdukcji czopkowej (knockout genu kodującego podjednostkę 3 kanału A zależnego od cGMP) [29]. Ponadto, myszy *math5^{-/-}*, u których w wyniku mutacji nie wykształcają się komórki zwojowe siatkówki i szlak siatkówkowo-podwzgórzowy (dochodzi zatem do genetycznego „odnerwienia” SCN), nie wykazywały synchronizacji rytmu aktywności ruchowej z warunkami oświetlenia środowiska [70]. Powyższe dane, w połączeniu z sugestiami na temat wzajemnych powiązań funkcjonalnych pomiędzy światłoczułymi komórkami zwojowymi zawierającymi melanopsynę a neuronami siatkówkowymi przenoszącymi informacje od pręcików i czopków, pozwalają przypuszczać, że do zachowania prawidłowych odpowiedzi niewzrokowych konieczna jest obecność w oku zarówno fotoreceptorów okołodobowych (ipRGCs), jak i klasycznych fotoreceptorów. Przypuszcza się także, że sygnały wzrokowe mogą być modulowane przez światłoczułe komórki zwojowe [3,11,15,61].

Fakt, że komórki zwojowe zawierające melanopsynę rozwijają się wcześniej i są funkcjonalnie dojrzałe już w dniu narodzin [63], czyli znacznie wcześniej niż klasyczne fotoreceptory [46], podkreśla jak duże znaczenie odgrywa u ssaków synchronizacja rytmów okołodobowych z warunkami oświetlenia środowiska. System „widzenia chronobiologicznego” pozwala na szybkie przestawienie się kompleksu zegara biologicznego z odbioru informacji o porze dnia zakodowanych w sygnałach wytwarzanych przez organizm matki (głównie w cząsteczkach melatoniny, która przechodzi przez

łożysko i działa na receptory melatoninowe zlokalizowane w SCN płodu [64,66]) na odbiór sygnałów powstających pod wpływem światła w oku noworodka [63]. Elektrofizjologiczna aktywność komórek zwojowych zawierających melanosynę w późnym okresie embrionalnym (spontaniczna) i we wczesnym okresie postnatalnym (zarówno spontaniczna jak i indukowana przez światło) sugeruje ponadto, że mogą one odgrywać istotną rolę w plastycznym dojrzewaniu struktur ośrodkowego układu nerwowego zaangażowanych w wytwarzanie i kontrolę rytmów okołodobowych [63].

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAILEY MJ, CASSONE VM. Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland. *Mol Brain Res* 2005; **134**: 345–348.
- [2] BAKALL B, MARNORSTEIN LY, HOPPE G, PEACHEY NS, WADELIUS C, MARMORSTEIN AD. Expression and localization of bestrophin during normal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 3622–3628.
- [3] BELENKY MA, SMERASKI CA, PROVENCIO I, SOLLARS PJ, PICKARD GE. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol* 2003; **460**: 380–393.
- [4] BELLINGHAM J, WHITEMORE D, PHILP AR, WELLS DJ, FOSTER RG. Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localization and phylogenetic position. *Mol Brain Res* 2002; **107**: 128–136.
- [5] BERSON DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 2003; **26**: 314–320.
- [6] BERSON DM, DUNN FA, TAKAO M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; **295**: 1070–1073.
- [7] BRAINARD GC, HANIFIN JP. Photons, clocks, and consciousness. *J Biol Rhythms* 2005; **20**: 314–325.
- [8] BULLOUGH JD, FIGUEIRO MG, POSSIDENTE BP, PARSONS RH, REA MS. Additivity in murine circadian phototransduction. *Zool Sci* 2005; **22**: 223–227.
- [9] CHAURASIA SS, ROLLAG MD, JIANG G, HAYES WP, HAQUE R, NATESAN A, ZATZ M, TOSINI G, LIU C, KORF HW, IUUVONE PM, PROVENCIO I. Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (*Opn4*): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *J Neurochem* 2005; **92**: 158–170.
- [10] CZEISLER CA, SHANAHAN TL, KLIERMAN EB, MARTENS H, BROTMAN DJ, EMENS JS, KLEIN T, RIZZO JF III. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med* 1995; **332**: 6–11.
- [11] DACEY DM, LIAO H-S, PETERSON B, ROBINSON FR, SMITH VC, POKORNY J, YAU K-W, GAMLIN PD. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 2005; **433**: 749–754.
- [12] DRIVENES O, SOVIKNES AM, EBBESSON LO, FJOASE A, SEO HC, HELVIK JV. Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain. *J Comp Neurol* 2003; **456**: 84–93.
- [13] FAHRENKRUG J, NIELSEN HS, HANNIBAL J. Expression of melanopsin during development of the rat retina. *Neuroreport* 2004; **15**: 781–784.
- [14] FAIN GL, MATTHEWS HR, CORNWALL MC, KOUTALOS Y. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 2001; **81**: 117–151.
- [15] FOSTER RG. Bright blue times. *Nature* 2005; **433**: 698–699.
- [16] FOSTER RG. Keeping an eye on the time. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 1286–1298.
- [17] FREEDMAN MS, LUCAS RJ, SONI B, VON SCHANTZ M, MUÑOZ M, DAVID-GRAY Z, FOSTER RG. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; **284**: 502–504.
- [18] FU Y, LIAO HW, DO MT, YAU K-W. Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 2005; **15**: 415–422.

- [19] FU Y, ZHONG H, WANG M-HH, LUO D-G, LIAO H-WM, MAEDA H, HATTAR S, FRISHMAN LJ, YAU K-W. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 10339–10344.
- [20] GOOLEY JJ, LU J, FISCHER D, SAPER CB. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 2003; **23**: 7093–7106.
- [21] HANNIBAL J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tiss Res* 2002; **309**: 73–88.
- [22] HANNIBAL J, FAHRENKRUG J. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 2004; **15**: 2317–2320.
- [23] HANNIBAL J, GEORG B, HINDERSSON P, FAHRENKRUG J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci* 2005; **27**: 147–155.
- [24] HANNIBAL J, HINDERSSON P, KNUDSEN SM, GEORG B, FAHRENKRUG J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 2002; **22**: RC191 (1–7).
- [25] HANNIBAL J, HINDERSSON P, NEVO E, FAHRENKRUG J. The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat, Spalax. *Neuroreport* 2002; **13**: 1411–1414.
- [26] HANNIBAL J, HINDERSSON P, ØSTERGAARD JM, GEORG B, HEEGAARD S, LARSEN PJ, FAHRENKRUG J. Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 4202–4209.
- [27] HARDIE RC, RAGHU P. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 2001; **413**: 186–193.
- [28] HATTAR S, LIAO H-W, TAKAO M, BERSON DM, YAU K-W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; **295**: 1065–1070.
- [29] HATTAR S, LUCAS RJ, MROSOVSKY N, THOMPSON S, DOUGLAS RH, HANKINS MW, LEMI J, BIEL M, HOFMANN F, FOSTER RG, YAU K-W. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003; **424**: 76–81.
- [30] HE S, DONG W, DENG Q, WENG S, SUN W. Seeing more clearly: recent advances in understanding retinal circuitry. *Science* 2003; **302**: 408–411.
- [31] HERMANN R, POPPE L, PILBAK S, BODEN S, MAURER J, WEBER S, LERCHL A. Predicted 3D-structure of melanopsin, the non-rod, non-cone photopigment of the mammalian circadian clock, from Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett* 2005; **376**: 76–80.
- [32] ISOLDI MC, ROLLAG MD, DE LAURO CASTRUCCI AM, PROVENCIO I. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 1217–1221.
- [33] KISELEV A, SUBRAMANIAM S. Studies of Rh1 metarhodopsin stabilization in wild-type *Drosophila* and in mutants lacking one or both arrestins. *Biochemistry* 1997; **36**: 2188–2196.
- [34] KUMBALASIRI T, PROVENCIO I. Melanopsin and other novel mammalian opsins. *Exp Eye Res* 2005; **81**: 368–375.
- [35] LAMB TD, PUGH EN Jr. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 2004; **23**: 307–380.
- [36] LOCKLEY SW, SKENE DJ, ARENDT, TABANDEH H, BIRD AC, DEFRACE R. Relationship between melatonin rhythms and visual loss in blind. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3763–3770.
- [37] LUCAS RJ, FOSTER RG. Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinol* 1999; **140**: 1520–1524.
- [38] LUCAS RJ, DOUGLAS RH, FOSTER RG. Characterization of ocular photopigment capable of driving papillary constriction in mice. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 621–626.
- [39] LUCAS RJ, FREEDMAN MS, MUÑOZ M, GARCIA-FERNANDEZ J-M, FOSTER RG. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; **284**: 505–507.
- [40] LUCAS RJ, HATTAR S, TAKAO M, BERSON DM, FOSTER RG, YAU K-W. Diminished papillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 2003; **299**: 245–247.
- [41] MELYAN Z, TARTTELIN EE, LUCAS RJ, HANKINS MW. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 2005; **433**: 741–745.
- [42] MONTELL C. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol* 2005; **567**: 45–51.
- [43] MORIN LP, BLANCHARD JH, PROVENCIO I. Retinal ganglion cell projections to the hamster supra-chiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 2003; **465**: 401–416.
- [44] MROSOVSKY N, HATTAR S. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int* 2003; **20**: 989–999.

- [45] MROSOVSKY N, LUCAS RJ, FOSTER RG. Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms* 2001; **16**: 585–588.
- [46] MUÑOZ-LLAMOSAS M, HUERTA JJ, CERNUTA-CERNUTA R, GARCIA-FERNANDEZ JM. Ontogeny of photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; **120**: 1–6.
- [47] PANDA S, NAYAK SK, CAMPO B, WALKER JR, HOGENESCH JB, JEGLA T. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 2005; **307**: 600–604.
- [48] PANDA S, PROVENCIO I, TU DC, PIRES SS, ROLLAG MD, CASTRUCCI AM, PLETCHER MT, SATO TK, WILTSHIRE T, ANDAHAZY M, KAY SA, VAN GELDER RN, HOGENESCH JB. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 2003; **301**: 525–527.
- [49] PEIRSON SN, BOVEE-GEURTS PH, LUPI D, JEFFERY G, DE GRIP WJ, FOSTER RG. Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (*Opn4*) in the mouse retinal pigment epithelium. *Mol Brain Res* 2004; **123**: 132–135.
- [50] PEPE IM. Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Prog Retin Eye Res* 2001; **20**: 733–759.
- [51] PROVENCIO I, JIANG G, DE GRIP WJ, HAYES WP, ROLLAG MD. Melanopsin: an opsin in melano-phores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 340–345.
- [52] PROVENCIO I, RODRIGUEZ IR, JIANG G, HAYES WP, MOREIRA EF, ROLLAG MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 2000; **20**: 600–605.
- [53] PROVENCIO I, ROLLAG MD, CASTRUCCI AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 2002; **415**: 493.
- [54] QIU X, KUMBALASIRI T, CARLSON SM, WONG KY, KRISHA V, PROVENCIO I, BERSON DM. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 2005; **433**: 745–749.
- [55] RATTO GM, ROBINSON DW, YAN B, MC NAUGHTON PA. Development of the light response in neonatal mammalian rods. *Nature* 1991; **351**: 654–657.
- [56] ROLLAG MD, BERSON DM, PROVENCIO I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 2003; **18**: 227–234.
- [57] RUBY NF, BRENNAN TJ, XIE X, CAO V, FRANKEN P, HELLER HC, O'HARA BF. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 2002; **298**: 2211–2216.
- [58] SAKAMOTO K, LIU C, KASAMATSU M, POZDEYEV NV, IUUVONE PM, TOSINI G. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 2005; **22**: 3129–3136.
- [59] SAKAMOTO K, LIU C, TOSINI G. Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci* 2004; **24**: 9693–9697.
- [60] SEKARAN S, LUPI D, JONES SL, SHEELY CJ, HATTAR S, YAU K-W, LUCAS RJ, FOSTER RG, HANKINS MW. Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol* 2005; **15**: 1099–1107.
- [61] SEMO M, LUPI D, PEIRSON S, BUTLER JS, FOSTER RG. Light-induced *c-fos* in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (*rd/rd cl*) mice. *Eur J Neurosci* 2003; **18**: 3007–3017.
- [62] SEMO N, MUÑOZ-LLAMOSAS M, FOSTER RG, JEFFERY G. Melanopsin (*Opn4*) positive cells in the cat retina are randomly distributed across the ganglion cell layer. *Vis Neurosci* 2005; **22**: 111–116.
- [63] SERNAGOR E. Retinal development: second sight comes first. *Curr Biol* 2005; **15**: R556R–559.
- [64] SERON-FERRE M, TORRES C, PARRAGUEZ VH, VERGARA M, VALLADARES L, FORCELLEDO ML, CONSTANDIL L, VALANZUELA GJ. Perinatal neuroendocrine regulation. Development of the circadian time-keeping system. *Mol Cell Endocrinol* 2002; **186**: 169–173.
- [65] TARTTELIN EE, BELLINGHAM J, BIBB LC, FOSTER RG, HANKINS MW, GREGORY-EVANS K, GREGORY-EVANS CY, WELLS DJ, LUCAS RJ. Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp Eye Res* 2003; **76**: 393–396.
- [66] THOMAS L, DREW JE, ABRAMOVICH DR, WILLIAMS LM. The role of melatonin in the human fetus (review). *Int J Mol Med* 1998; **1**: 539–543.
- [67] TOMONARI S, TAKAGI A, AKAMATSU S, NOJI S, OBUCHI H. A non-canonical photopigment, melanopsin, is expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken retina. *Dev Dynamics* 2005; **234**: 783–790.
- [68] TU DC, ZHANG D, DEMAS J, SLUTSKY EB, PROVENCIO I, HOLY TE, VAN GELDER RN. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 2005; **48**: 987–999.

- [69] VON SHANTZ M, PROVENCIO I, FOSTER RG. Recent developments in circadian photoreception: more than meets the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1605–1607.
- [70] WEE R, CASTRUCCI AM, PROVENCIO I, GAN L, VAN GELDER RN. Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in *math5^{-/-}* mice. *J Neurosci* 2002; **22**: 10427–10433.
- [71] WONG KY, DUNN FA, BERSON DM. Photoreceptor adaptation in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 2005; **48**: 1001–1010.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 03.01. 2006 r.

Przyjęto: 14.03. 2006 r.

CBM PAN, 93-232 Łódź, ul. Lodowa 106

email: jzawilska@pharm.am.lodz.pl